

Vergleich zweier Methoden zur Kreatininbestimmung

Ulrich Groth

1967

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. P. Schölmerich

Vergleich zweier Methoden zur Kreatininbestimmung

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen

Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

U l r i c h G r o t h

aus Kirburg / Westerwald

1967



Dekan : Professor Dr. L. Diethelm
Referent : Professor Dr. W. Gerok
Korreferent : Professor Dr. P. Schölmerich

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
I. Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen	1
II. Biochemie des Kreatinins	2
III. Die diagnostische Bedeutung der Kreatininbestimmung	4
B. Methodik	8
I. Beschreibung bisher verwendeter Analysenverfahren zur Bestimmung des Kreatinins in Blut, Serum und Urin	8
1. Methoden ohne Abtrennung des Kreatinins	8
2. Methoden mit Abtrennung des Kreatinins	...14
II. Methodik der eigenen Untersuchungen	...19
1. Die Jaffe-Reaktion	...19
2. Die Tetraphenylborat-Methode	...19
3. Arbeitsvorschrift	...25

	Seite
C. Mathematisch-statistische Methodik	...30
I. Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient	...30
II. Der t-Test	...31
III. Korrelations- und Regressionsrechnung	...32
D. Ergebnisse	...36
I. Übersicht	...36
II. Mathematisch-statistische Auswertung	...41
1. Vergleich der Meßergebnisse	...41
2. Zusammenhang zwischen Jaffe-Reaktion und TPB-Methode	...43
3. Schwankung des Serumkreatininspiegels beim Einzelindividuum	...54
E. Diskussion	...60
F. Zusammenfassung	...65
Literaturverzeichnis	...66

A. E i n l e i t u n g

I. Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen.

Im Jahre 1886 veröffentlichte JAFFE eine Arbeit "Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins". Er beschrieb darin die Bildung eines roten Farbstoffes aus Pikrinsäure und Kreatinin.

Mit zunehmend häufigerer Verwendung der Kreatininbestimmung in der medizinischen Diagnostik sind in den folgenden Jahrzehnten zahlreiche Versuche angestellt worden, diese Reaktion spezifischer zu gestalten oder eine neue, genauere Bestimmungsmethode zu finden. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß die Jaffesche Reaktion Reduktionsmittel wie Glucose (KLERKER; HAUGEN), Ascorbinsäure (MERTZ) und Stoffe, die eine enolisierbare Carbonylgruppe tragen (WEISE u. TROPP), wie Acetessigsäure (FOLIN), Brenztraubensäure (KOSTIR u. SONKA), Aceton (JAFFE; HAUGEN) und viele andere Substanzen (HUNTER u. CAMPBELL) in unterschiedlichem Ausmaß mit erfaßt.

Die Jaffesche Reaktion täuscht also einen Kreatiningehalt vor, der die Größe der "wahren Kreatininkonzentration" um einen bestimmten Betrag übertrifft. Dieser Anteil an sogenannten "Nichtkreatininchromogenen" am gesamten mit Pikrinsäure farbgebenden, "Jaffe-positiven" Material wird in der Literatur je nach verwendeter Bestimmungsmethode recht unterschiedlich mit 5 bis 15% angegeben (ANKER; DOOLAN). Nach DOOLAN schwanken die Nichtkreatininchromogene bei normalem Kreatininspiegel zwischen 0.04 und 0.29 mg/100 ml im Serum und sind bei Retention harnpflichtiger Stoffe nur unwesentlich erhöht.

Bei den vorliegenden Untersuchungen sollte ein neues, von BEYERMANN entwickeltes, Kreatinin selektiv isolierendes Abtrennungsverfahren erstmals an einem größeren Patienten-gut auf seine klinisch-chemische Brauchbarkeit getestet werden.

II. Biochemie des Kreatinins.

Kreatinin wurde zum erstenmal 1844 im Harn aufgefunden, nachdem schon 1835 von Chevreul und 1847 von Liebig das Kreatin aus dem Wirbeltiermuskel isoliert worden war. Die Erforschung der physiologischen Bedeutung und des biochemischen Verhaltens des Kreatinins und seiner Vorstufen begann aber erst 1905, als FOLIN eine bequeme quantitative Bestimmungsmethode für Kreatin und Kreatinin ausarbeitete. Die fortschreitende Aufklärung der enzymatischen Vorgänge im intermediären Stoffwechsel ließ schließlich die biogenetischen Beziehungen erkennen, die Kreatinin mit Kreatin, Glycin und Glykocyamin verbinden.

Um den Bildungsmechanismus des Kreatins aufzuklären, wurden in Verfütterungsversuchen und bei Durchströmung der isolierten, überlebenden Leber und anderen experimentellen Anordnungen eine Reihe von den nach der chemischen Struktur in Frage kommenden Stoffen auf ihre Beteiligung an der Synthese geprüft.

6-Guanidocaprinsäure, 4-Guanidobuttersäure, Methylguanidobuttersäure, Methylguanidocaprinsäure und 6-N-Methylarginin lieferten kein Kreatin (THOMAS u. GOERNE; THOMAS, KAPFFHAMMER u. FLASCHENTRÄGER). Verschiedene Aminosäuren wie Arginin (SHAPIRO u. ZWARENSTEIN; GROSS u. STEENBOCK; BEARD u. BOGGESS; BODANSKY; MYERS u. FINE), Histidin (BEARD u. BARNES; BAUMANN u. HINES), Alanin (BEARD u. BARNES; Mc KAY u.

BARNES), Tyrosin (SHAPIRO u. ZWARENSTEIN), Serin, Valin (BEARD u. BOGGESE) und Glutaminsäure (Mc KAY u. BARNES; SHAPIRO u. ZWARENSTEIN) ergaben wechselnde, sowohl positive als auch negative Resultate.

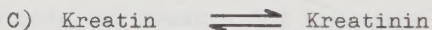
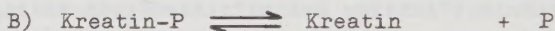
BLOCH u. SCHOENHEIMER zeigten dann unter Verwendung von N^{15} -markiertem Arginin, daß der Amidinrest des Arginin auf Glycin unter Bildung von Glycocyamin (Guanidinoessigsäure) übertragen wird. BORSOOK u. DUBNOFF bestätigten diese Reaktion an Leberschnitten. Die Transamidierung verläuft unter dem katalytischen Einfluß des Enzyms Transamidinase. Die Transmethylierung von Glycocyamin zu Kreatin erfolgt in ATP-abhängiger Reaktion durch den Methyl-Donator Methionin ("Aktives Methyl"; Adenosylmethionin). Die Reaktion findet nach BORSOOK u. DUBNOFF in der Niere statt.

Die Kenntnis der Strukturformeln von Kreatin und Kreatinin wie auch die Tatsache, daß im gesunden Organismus nur Kreatinin im Harn nachgewiesen wurde, führte zu der Annahme, daß Kreatinin aus der Vorstufe Kreatin entsteht und als Stoffwechselprodukt von der Niere ausgeschieden wird. BENEDICT u. OSTERBERG und CHANUTIN bestätigen bei längerdauernder Kreatinzufuhr die Umwandlung in Kreatinin, während vorher FOLIN und KLERKER bei einmaliger Kreatinzufuhr keine Steigerung der Kreatininausscheidung feststellen konnten. Die verzögerte Kreatininausscheidung wurde durch eine erhebliche Speicherfähigkeit von Leber und Niere für Kreatin erklärt (BODANSKY, DUFF u. HERRMANN).

Nachdem man zunächst einen enzymatisch gesteuerten Übergang von Kreatin in Kreatinin vermutet hatte, wurde später festgestellt, daß sich die Umwandlung in Organextrakten wie in einer entsprechend konzentrierten und gepufferten wäßrigen Lösung vollzieht (HAHN u. BARKAN; HAHN u. MEYER). Zwischen Kreatin und Kreatinin besteht in wäßriger Lösung ein Gleichgewichtszustand. Die Umwandlung verläuft nach dem Typus einer Reaktion erster Ordnung. Das Gleichgewicht wird mit zu-

nehmender OH-Ionenkonzentration schneller erreicht. In saurer Lösung wandelt sich Kreatin temperaturabhängig vollständig in Kreatinin um (HAHN u. BARKAN; EDGAR u. SHIVER; EDGAR u. WAKEFIELD).

Die spontane Umwandlung von Kreatin in Kreatinin verläuft bei 37° C und dem pH der Körperzelle zu langsam, um die täglich ausgeschiedene Kreatininmenge allein aus dem Gewebskreatin zu liefern (HAHN u. BARKAN). Nach BORSOOK u. DUBNOFF laufen folgende Reaktionen bei 38° C in wäßriger Lösung von Kreatinphosphorsäure ab:



Es handelt sich um nicht enzymatisch gesteuerte, voneinander unabhängige Reaktionen I.Ordnung. Reaktion A verläuft drei bis viermal schneller als Reaktion C. Die Reaktionen A und C reichen aus, um die täglich ausgeschiedene Menge an Kreatinin zu liefern.

Der Stoffwechselweg des Kreatinins wird in Abb.1 in einem Reaktionsschema verdeutlicht.

Zusammenfassend ergibt sich, daß Kreatinin als Endprodukt verschiedener Reaktionen vornehmlich aus der Kreatinphosphorsäure entsteht und keinem weiteren Abbau unterliegt. Als Stoffwechselendprodukt wird es schließlich über die Niere ausgeschieden.

III. Die diagnostische Bedeutung der Kreatininbestimmung.

Im klinisch-chemischen Laboratorium wird die Kreatininbestimmung heute fast allgemein als routinemäßiger Suchtest

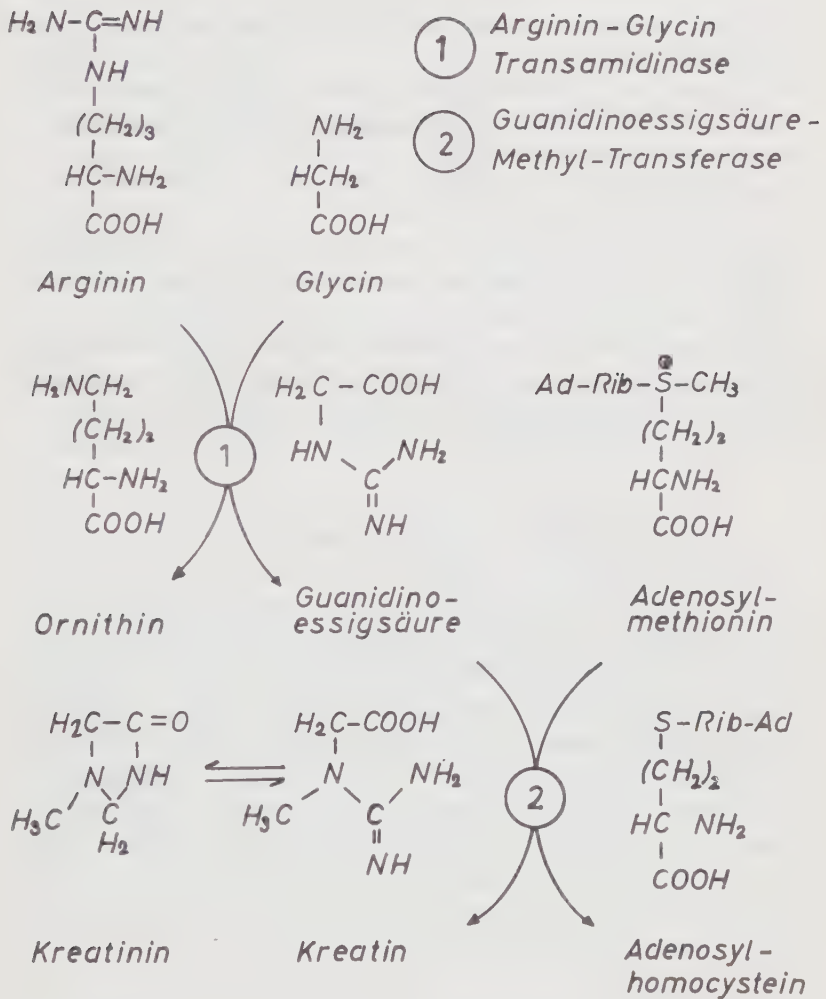


Abb.1 = Stoffwechselweg des Kreatinins.

vorgenommen, um auf eine intakte oder reduzierte Funktionsfähigkeit der Niere zu schließen. Dabei kann man das Kreatinin sowohl im Serum als auch im Urin erfassen. Die Schlußfolgerungen, die aus beiden Bestimmungsmöglichkeiten für die diagnostische Interpretation einer vorliegenden Nierenerkrankung gezogen werden können, sollen im folgenden kurz diskutiert werden.

Da nach dem dargestellten physiologisch-chemischen Verhalten des Kreatinins seine Ausscheidung als Maß für die Funktionstüchtigkeit der Nieren gelten kann, schlug REHBERG 1926 die exogene Kreatinin clearance vor, die aber im Vergleich zur Inulin clearance viel zu hohe Werte für das Glomerulumfiltrat ergab. 1937 führten POPPER u. MANDEL und MILLER u. DUBOS die endogene Kreatinin clearance ein. Da der Quotient

$$Q = \frac{\text{Endogene Kreatinin clearance}}{\text{Inulin clearance}}$$

schon bei nicht nierenkranken Individuen größer als 1 ist und bei Nierenschädigung Werte bis zu 1,6 erreicht (BROD u. SIROTA), mußte eine schon normalerweise vorhandene tubuläre Sekretion von Kreatinin angenommen werden, die sich bei zunehmender Funktionseinbuße der Niere noch verstärkt (REUBI). Da die Kreatinin clearance aus den genannten Gründen kein genaues Maß für die glomeruläre Filtration darstellt und ausserdem großen individuellen Schwankungen unterworfen ist, wird ihre Zuverlässigkeit besonders bei reduzierter Nierenfunktion in Frage gestellt und als nur unvollkommener Ersatz für die Inulin clearance betrachtet (SARRE).

Andere Autoren bewerten die Vorteile der Kreatinin clearance höher als ihre Nachteile. Da der Kreatinin plasmaspiegel während der Dauer einer Clearanceuntersuchung praktisch konstant ist (HAUGEN u. BLEGEN), entfällt die bei der umständlichen und zeitraubenden Inulin clearance durchzuführende

Dauerinfusion eines unphysiologischen Stoffes mit den gleichzeitig notwendigen wiederholten Plasmaspiegelbestimmungen. Nach POPPER u. MANDEL kann man die endogene Kreatininclearance zumindest zur semiquantitative Beurteilung der renalen Funktionsminderung heranziehen.

Schon VAN SLYKE fand bei Niereninsuffizienz einen Anstieg des Kreatininplasmaspiegels, während die endogene Clearance vermindert war. Die untersuchten Fälle ergaben bei graphischer Darstellung der beiden Variablen eine befriedigende Übereinstimmung mit der theoretisch zu fordernden hyperbolischen Funktion. VAN SLYKE hielt jedoch, - wahrscheinlich von der noch unzulänglichen Bestimmungsmethode für Kreatinin beeinflusst -, das Verhalten des Blutharnstoffs für das feinere Zeichen in der Beurteilung einer renalen Funktionsstörung.

HAUGEN u. BLEGEN kamen mit verbesserter Bestimmungsmethode zu der Ansicht, daß die Kreatininämie als Maß für eine gestörte Nierentätigkeit größte Bedeutung habe. Auch REUBI zieht die Bestimmung des Kreatininspiegels im Serum der eines erhöhten Reststickstoffs als Maßstab für die Beurteilung des Ausmaßes einer renalen Funktionsstörung vor. Er betont aber, daß weder die Kenntnis des Rest-N noch die der Kreatininämie von der Verpflichtung entbindet, zur quantitativen Feststellung des Schweregrades einer Nephropathie repräsentativere Untersuchungsmethoden anzuwenden.

B. Methodik

I. Beschreibung bisher verwendeter Analysenverfahren zur Bestimmung des Kreatinins in Blut, Serum und Urin.

1. Methoden ohne Abtrennung des Kreatinins.

a) Die Jaffe- Reaktion:

Im Jahre 1886 beschrieb JAFFE eine qualitative Nachweisreaktion für Kreatinin, die auf der Bildung eines roten Farbproduktes mit alkalischer Pikrinsäurelösung beruht. FOLIN verwendete diese Reaktion zu einer quantitativen colorimetrischen Bestimmungsmethode, die seither die Grundlage für die am häufigsten verwendeten Analysenverfahren bildet. Da die Jaffe-Reaktion auch bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet wird, soll die Reaktion etwas eingehender dargestellt werden.

GREENWALD hält die gebildete rote Farbe für ein Salz aus Kreatinin, Pikrinsäure und NaOH. Nach ABE reagiert Pikrinsäure schon allein mit NaOH zu dem Komplex (Pikrat-Anion-OH)⁻. Die Annahme, es handele sich bei dem Farbprodukt um Pikraminsäure, wird von CLARKE widerlegt, der unterschiedliche Absorptionsspektren der beiden Substanzen findet. ARCHIBALD schließlich schreibt die Farbe bei Temperaturen unter 30° C und einer Farbentwicklungszeit von 15 min. fast ausschließlich dem roten Tautomeren von Kreatininpikrat zu, während bei zunehmender Reaktionsdauer und steigender Temperatur Methylguanidin und ein Reduktionsprodukt von Pikrinsäure, vermutlich Pikraminsäure, gebildet wird.

Abhängigkeit von der Pikrinsäurekonzentration:

Die Farbintensität ist über einen ziemlich großen Bereich unabhängig von der Pikrinsäurekonzentration, mit zunehmen-

der Konzentration jedoch nimmt die Stärke der Farbewicklung ab (HENRY).

Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration:

Die Farbintensität alkalischer Pikrinsäurelösung nimmt ab mit fallendem pH (OWEN u. Mitarb.; ROSCOE), beim Kreatininpikrat dagegen steigt sie mit fallendem pH an (BIGGS u. COOPER; OWEN u. Mitarb.; ROSCOE). Bei der Wahl eines eventuell zu benutzenden Enteiweißungsmittels ist zu beachten, daß im pH-Bereich von 3 bis 4,5 etwa 85 bis 90% des Kreatinins in das Filtrat übergehen (OWEN u. Mitarb.), bei einem pH von 2 und weniger dagegen 100% (HARE; VAN PILSUM u. BOVIS). Trichloressigsäure ist mit einem pH von weniger als 2 der vielfach verwendeten Wolframsäure als Proteinfällungsmittel vorzuziehen, bei deren Verwendung der pH des proteinfreien Filtrates zwischen 3 und 4,5 liegt.

Spezifität:

Ein großer Nachteil der Jaffe-Reaktion ist ihre mangelnde Spezifität. HUNTER gibt 38 in biologischen Substraten vorkommende Stoffe an, die mit Pikrinsäure eine rotgefärbte Verbindung bilden. Die wichtigsten dieser Substanzen sind Glucose, Ascorbinsäure, Acetessigsäure, Brenztraubensäure und Aceton (vgl. Teil A.I.).

Die Jaffe-Reaktion erzielt also nur dann gut reproduzierbare Ergebnisse, wenn man die genannten Abhängigkeiten beachtet und besonders für die optimale und konstante Einstellung des pH-Wertes sorgt. Ein wesentlicher Nachteil ist ihre geringe Spezifität.

b) Modifikationen der Jaffe-Reaktion.

aa) Oxydation von Brenztraubensäure mit Cersulfat.

KOSTIR u. SÓNKA wiesen 1952 nach, daß Cersulfat Brenztraubensäure, einen der Jaffe-positiven Stoffe, oxydiert, ohne

den Kreatiningehalt im Serum zu beeinflussen. Sie gaben für den Kreatininspiegel im Serum einen Normalwert von 0.48 mg/100 ml mit einem Schwankungsbereich von 0.3 bis 0.6 mg/100 ml an. Vergleichende Untersuchungen mit der Pikratmethode lieferten etwa 1.0 mg/100 ml Kreatinin im Serum, während nach Adsorption an Lloyd's Reagenz 10% niedrigere Werte gemessen wurden.

bb) Ätherextraktion.

TAUSSKY u. KURZMANN haben 1954 die Spezifität der Jaffe-Reaktion verbessert, indem sie Urin vor der photometrischen Bestimmung mit Äther extrahierten, um Störungen durch Protein, Aceton, Acetessigsäure, Fructose und Glucose zu beseitigen.

Äther extrahiert Glucose und Fructose nicht, sondern setzt die Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Substanzen mit alkalischer Pikrinsäurelösung herab. Da auch Ascorbinsäure in der Ätherphase nachweisbar ist, wird die Extraktion für sehr nützlich gehalten. LINNEWEH u. LINNEWEH fanden ebenfalls verringerte Störungen nach 10 bis 30 Stunden Ätherbehandlung.

Bis 1.5 g/100 ml zugesetztes Protein stört die Ätherextraktion nicht. Das Eiweiß flottiert an der Grenzschicht zwischen Äther und Wasser. Die wäßrige Phase bleibt klar.

cc) Oxydation mit Jod.

Um die Störstoffe zu beseitigen, behandelte TAUSSKY enteiweißtes Plasma zuerst oxydierend mit Jod, dann mit Zink in saurer Lösung und extrahierte schließlich mit Äther. Einige Ketosäuren werden durch Zink zu der nicht störenden Hydroxyform reduziert, Phenolsulfophthalein und Bromsulfophthalein werden in die Leukoverbindungen überführt. Eiweiß muß vor

der Reaktion entfernt werden. Im übrigen wirkt die Behandlung wie die Ätherextraktion im Urin.

Es werden Normalwerte von 0.5 bis 1.0 mg Kreatinin/100 ml Plasma angegeben.

c) Kreatininbestimmung mit 3,5-Dinitrobenzoesäure.

1936 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine Bestimmungsmethode für Kreatinin in Blut und Urin, die sich auf die purpurrote Farbentwicklung mit 3,5-Dinitrobenzoesäure gründet (BENEDICT u. BEHRE und LANGLEY u. EVANS).

Die Farbintensität des Reaktionsproduktes fällt schnell ab, wenn nach etwa 10 min. das Maximum überschritten ist. Die Stabilität der Farbe ist unter Lichteinwirkung gering. Die Empfindlichkeit gegenüber kleinen Variationen der Methodik zwingt im Vergleich zur Jaffe-Reaktion zu größerem technischen Aufwand. BENEDICT u. BEHRE bezweifeln aus diesen Gründen die Eignung des Analysenverfahrens für Routinearbeit.

Glucose stört auch in hohen Konzentrationen nicht. Aceton, Acetessigsäure und Hydantoin reagieren mit Dinitrobenzoesäure, jedoch schwächer als Kreatinin. Die Nachweisgrenze für die qualitative Identifizierung von Kreatinin liegt bei 0.01 mg/100 ml, eine zur quantitativen Bestimmung ausreichende Farbintensität wird ab 0.2 mg/100 ml erreicht.

LANGLEY u. EVANS fanden mit Dinitrobenzoesäure Kreatininspiegel im Serum, die nur 58% der mit Pikrinsäure erhaltenen Vergleichswerte betragen. Die Verwendung von Lloyd's Reagenz in der Hand dieser Autoren bestätigte diese bisher nicht wieder beschriebenen extrem niedrigen Kreatininkonzentrationen. BENEDICT u. BEHRE prüften Blutfiltrate auf ihren Kreatiningehalt. Das Reaktionsprodukt unterschied

sich so sehr von der mit reinen Kreatininlösungen und Din-
nitrobenzoesäure gebildeten Färbung, daß es nicht zur Kre-
atininbestimmung herangezogen werden konnte. Die Autoren
kamen zu dem Schluß, daß das chromogene Material im Blut
kein Kreatinin ist.

d) Nephelometrische Bestimmung mit Nessler's Reagenz.

Die qualitative Nachweisreaktion für Kreatinin von BARRET
(1936) mit Nessler's Reagenz ($K_2(HgJ_4)$) wurde von BARCLAY
u. KENNEY (1947) zur quantitativen Methode umgeformt. Durch
optimale Wahl der Reagenzkonzentration (1 g Nessler's Rea-
genz, 18 g NaOH und 7.5 g KJ/100 ml) soll in alkalischer
Lösung eine fast spezifische Reaktion mit Kreatinin erreicht
werden. Kreatin, Ammoniak, Guanidin, Methylguanidin, Sarko-
sin und Harnsäure reagieren nicht, Hydantoin schwach. Unter
den gewählten Bedingungen ist der fördernde Einfluß von Glu-
cose auf die Kreatininreaktion ausgeschaltet. Die Bestimmung
des Reaktionsproduktes geschieht nephelometrisch.

Die Reaktion wurde an Gewebfiltraten, Urin und an mit Zink-
hydroxyd oder Wolframsäure enteiweißten Serumproben durchge-
führt. Ein Vergleich mit der enzymatischen Methode von
MILLER u. DUBOS ergab gute Übereinstimmung.

e) Bestimmung mit Kaliumquecksilberthiocyanat und Dithizon.

STELGENS (1953) nutzte das Reduktionsvermögen des Kreatinins
aus, um aus einer alkalischen Lösung von Kaliumquecksilber-
thiocyanat metallisches Hg abzuscheiden, das mit dem Schwer-
metallreagenz Dithizon eine Farbreaktion ergibt. Die colori-
metrische Bestimmung wurde mit dem Stufenphotometer (Pulfr-
ich) vorgenommen. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt,
daß Kreatin, Glycocyamin, Guanidin und Harnstoff nicht mit-
reagieren. Harnsäure setzt nur Spuren von Hg frei. Die Mit-
reaktion von Glucose wird durch Temperaturerniedrigung auf

8 bis 10° C deutlich herabgesetzt. Cystein bindet mit seiner Sulfhydrylgruppe Hg, so daß die Reaktion gehemmt wird. Störungen durch Schwermetalle werden durch analysenreine Reagentien und doppelt destilliertes Wasser praktisch ausgeschlossen.

Der Autor hält die Methode für spezifischer als die Jaffe-Reaktion. Er gibt bei Kindern eine mittlere Kreatininkonzentration von 0.75 mg/100 ml an.

f) Bestimmung des Kreatinins als Methylguanidin.

Kreatinin bildet mit o-Nitrobenzaldehyd in alkalischem Milieu Oxalylmethylguanidin, das nach Neutralisation der Lösung durch Erhitzen in Methylguanidin umgewandelt wird. Methylguanidin wird mit einem modifizierten Sakaguchi-Farbreakenz, einem alkalischen α -Naphthol-Thymin-Natriumthiosulfatgemisch, colorimetrisch gegen einen Leerwert bestimmt. (VAN PILSUM u. Mitarb.).

Die Ausbeute der Umwandlung von Kreatinin in Methylguanidin beträgt 95%. O-Nitrobenzaldehyd ist im Reaktionsgemisch farblos und stört die Sakaguchi-Farbreaktion nicht. Die im Blut oder Urin vorkommenden Sakaguchi-positiven Stoffe sind Kreatin, Kreatinin, Arginin, Guanidinoessigsäure und Guanidin. Methylguanidin wird nicht als normaler Bestandteil von Körperflüssigkeiten angesehen.

Die Methode liefert durchschnittliche Kreatininwerte in Normalblut von 0.60 mg/100 ml. In einer späteren Arbeit (VAN PILSUM u. BOVIS 1957) wurden 0.8 ± 0.11 mg/100 ml gefunden. Die gleichzeitig durchgeführte Vergleichsanalyse mit dem Jaffeschen Verfahren ergab 1.0 ± 0.14 mg/100 ml Gesamtchromogene.

g) Bestimmung mit 1.4- Naphthochinon-2- Kaliumsulfonat.

SULLIVAN u. IRREVERRE benutzten 1957 eine schon 1939 von ihnen gefundene Farbreaktion des Kreatinins mit 1.4- Naphthochinonsulfonsäure. Die Bestimmung wird colorimetrisch in enteweißten Blutfiltraten und Urin vorgenommen.

Die störenden Substanzen Aceton und Indol müssen durch Extraktion mit Toluol entfernt werden. Die bei der Dinitrobenzoesäure-Methode farbgebenden Stoffe Glykocyamidin, Hydantoin, Thiohydantoin, Hydantoinderivate verschiedener Aminosäuren und Methylisothioharnstoff reagieren mit 1.4- Naphthochinonsulfonsäure nicht. Ebenso verhalten sich die mit Pikrinsäure reagierenden Verbindungen Methylamin, Iso-barbitursäure, Aminoguanidin und p-Aminhippursäure.

Der Vergleich von Naphthochinon-Reaktion, Dinitrobenzoesäure-Methode und Jaffe-Reaktion ergibt im Urin praktisch identische Werte. Bei Blutfiltraten fällt der Vergleich ungünstig aus. Die Ergebnisse werden nur als Näherung bezeichnet, da die Kreatininbeträge nur sehr klein und die Farbintensitäten gering sind. Das Resultat, daß bei allen drei Methoden Werte in der gleichen Größenordnung gefunden werden, führt im Hinblick auf die Befunde von BENEDICT u. BEHRE (1936) zu der Entscheidung, daß Kreatinin in geringer Konzentration im Blut vorkommt. Genaue Angaben über die Kreatininkonzentration werden von SULLIVAN u. IRREVERRE nicht gemacht.

2. Methode mit Abtrennung des Kreatinins.

a) Adsorption an Lloyd's Reagenz.

Die ersten Versuche, Kreatinin selektiv abzutrennen, unternahmen 1918 GREENWALD u. MC GUIRE. Sie stellten fest, daß

Kreatinin an Kaolin adsorbiert wird und so von den anderen Jaffe-positiven Stoffen abgetrennt werden kann. In der Folgezeit wurde Lloyd's Reagenz, ebenso wie Kaolin ein Aluminiumsilikat, häufig bei vergleichenden Untersuchungen verwendet, um Aussagen über die Spezifität verschiedener Bestimmungsmethoden zu gewinnen.

HARE zeigte, daß Kreatinin vollständig an Lloyd's Reagenz adsorbiert wird. Bei den meisten Nichtkreatininchromogenen besteht diese Wechselwirkung nicht (BARKLEY u. KENNEY; RALSTON). KANTUREK, PAKOVSKY u. SONKA jedoch weisen auf die Adsorption Jaffe-positiver Substanzen wie Indol, Hydantoin, Glycocyamidin und verschiedener Steroide und Ketosäuren hin.

Zur Bestimmung wird Lloyd's Reagenz enteiweißten Serumfiltraten oder Urin in wäßriger Suspension zugefügt. Man zentrifugiert und dekantiert. Das adsorbierte Material wird mit alkalischer Pikrinsäurelösung von dem Aluminiumsilikat eluiert und spektrophotometrisch gemessen.

Die Ergebnisse bei vergleichender Anwendung von Lloyd's Reagenz und Jaffe-Reaktion schwanken von Autor zu Autor ziemlich stark, jedoch werden bei ersterem allgemein deutlich niedrigere Kreatininwerte im Serum und nur etwa 2% geringere Kreatininkonzentrationen im Urin angegeben (DOOLAN).

b) Enzymatische Bestimmungsmethode.

MILLER u. DUBOS adaptierten 1937 einen Bakterienstamm auf Kreatinin, das sie ihm als einzige N- und C-Quelle anboten. Der Stamm bildet ein Enzym, das spezifisch nur Kreatinin aufspaltet und in Harnstoff überführt.

Die Totalchromogene wurden mit der Jaffe-Reaktion im Zeiss-Pulfrich Stufenphotometer bestimmt. Nach Inkubation mit dem Bakterienstamm wurde das verbleibende chromogene Material ebenfalls mit alkalischer Pikrinsäure nachgewiesen. Die

Differenz beider Werte ergibt den wahren Kreatiningehalt. Mit Ausnahme von Glycocyamidin werden Nichtkreatininchromogene von dem Bakterienstamm nicht abgebaut.

Als Normalwerte im Serum werden für Totalchromogene 1.09, für die Residualchromogene oder Nichtkreatininchromogene 0.10 mg/100 ml angegeben. Der echte Kreatiningehalt beträgt also 0.99 mg/100 ml, das sind 91% des gesamten chromogenen Materials im Serum. Im Urin liegt dieser Wert bei 98%.

Bei Nierenkranken erreichen die Residualchromogene im Serum mit zunehmender Retention höhere Werte, während der wahre Kreatiningehalt im Urin fast 100% des gesamten Jaffe-positiven Materials ausmacht.

ALLINSON bestätigte 1945 mit gleicher Methodik im wesentlichen die Ergebnisse von MILLER u. DUBOS.

c) Papierchromatographische Kreatininbestimmung.

MAW (1948) und KOSTIR u. RABEK verwendeten die Verteilungs-chromatographie zur Kreatininbestimmung. Deproteinisiert wird durch Ultrafiltration mittels Kollodiummembranen oder Acetonpräzipitation. Lösungsmittel sind Kollidin und Butanol in Wasser. Die Kreatininbande wird mit alkalischer Pikratlösung dargestellt.

Glycocyamidin zeigt R_f -Werte nahe denen des Kreatinins. KOSTIR u. RABEK weisen Pyruvat als zweite Jaffe-positive Komponente neben Kreatinin polarographisch und spektrometrisch nach. Mengen von 1 μ g können qualitativ noch bestimmt werden. Quantitative Messungen wurden nicht durchgeführt.

d) Hochspannungselektrophorese.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Guanidin-

derivate ermöglichen eine selektive Auftrennung in die einzelnen Komponenten mittels der Hochspannungselektrophorese (EPSTEIN u. FORMINA 1950; CLOTEN).

Die durch Anfärben mit Pikrinsäure und NaOH auf dem Papierstreifen rot markierte Kreatininbande wird aus dem ungefärbten Vergleichsstreifen ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Das Eluat wird zentrifugiert, um Papierfasern zu entfernen, und mit Dinitrobenzoesäure gegen entsprechend behandelte Blindwerte photometriert.

Der Fehler der Methode wird mit $\pm 3\%$ angegeben.

e) Ionenaustausch und Ultraviolett-Spektrophotometrie.

ADAMS, DAVIS u. HANSEN (1962) adsorbierten das Kreatinin an einen Kunstharzionenaustauscher (Dowex 2-8 X). Der Kreatiningehalt des Eluats wurde bei einem pH von 10.4 und einer Wellenlänge von 234.5 nm spektrophotometrisch mittels des Absorptionsspektrums gemessen.

Dreifache Messungen an 24-Stunden-Urinen Erwachsener stimmten gut überein (maximale Abweichung: 10%). Zum Urin hinzugefügtes Kreatinin wurde innerhalb eines Fehlerbereichs von $\pm 3\%$ wiedergefunden. Glucosurische und alkaptonurische Harne, Barbitursäurederivate und Sulfonamide beeinflussen die Resultate nicht, da sich beim Elutions-pH adsorbiert bleiben.

Der Vergleich mit Lloyd's Reagenz ergibt Abweichungen von 11 bis 46%, die unvollständiger und wechselnd starker Elution des Kreatinins von der Fullererde zugeschrieben werden. Ausserdem wird von ADAMS u. Mitarb. angenommen, daß die Nichtkreatininchromogene teilweise an Lloyd's Reagenz adsorbiert werden.

Die Autoren heben hervor, daß Kreatinin nicht chemisch ver-

ändert, sondern direkt gemessen wird. Das Meßergebnis ist also nicht von zusätzlichen Fehlerquellen wie Farbentwicklung, Farbstabilität und anderen inneren und äußeren Faktoren beeinflusst.

f) Mitfällung mit Butamylamintetraphenylborat.

BEYERMANN (1964) bestimmte Kreatinin durch Mitfällen mit Butamylamintetraphenylborat quantitativ bis zu Konzentrationen von 0.1 µg/ml. Das isolierte Kreatinin-Butamylamintetraphenylborat wird in Dimethylformamid gelöst und der Kreatiningehalt nach Pikratzusatz spektrophotometrisch gemessen.

Amine und Alkaloide bilden Niederschläge mit Tetraphenylborat. Von diesen und zahlreichen anderen Substanzen kann Kreatinin mit Hilfe der Mitfällungsreaktion nicht getrennt werden. Der Einfluß von etwa 300 Fremdsubstanzen auf das Abtrennungsverfahren und auf die Farbentwicklung bei der photometrischen Bestimmungsreaktion wurde geprüft. Die Störkonzentrationen der meisten Stoffe sind so groß, daß sie in biologischen Systemen nicht erreicht werden.

Wenn Glycocyamidin und Kreatinin in gleichen Mengen vorliegen, täuscht ersteres nach Mitfällung und Farbentwicklung in Dimethylformamid einen um 12% zu hohen Kreatininwert vor. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen ergaben im Harn Gesunder ein Kreatinin-Glycocyamidinverhältnis von etwa 10:1. Im Serum beträgt dieses Verhältnis 3 bis 6:1 (KOSTIR u. PRISTOUPIL).

II. Methodik der eigenen Untersuchungen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei Methoden verwendet, um den Kreatiningehalt von Serumproben zu bestimmen:

1. Die Jaffe-Reaktion,
2. Die Tetraphenylborat (TPB)-Extraktion mit nachfolgender Jaffe-Reaktion: TPB-Methode.

Venenblutproben eines unausgewählten Patientengutes wurden etwa 2 Stunden nach der Blutentnahme zentrifugiert. Das Serum wurde von den korpuskulären Bestandteilen abgetrennt, durchschnittlich 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und dann enteiweißt. Das Filtrat jeder Serumprobe wurde mit beiden Methoden analysiert.

1. Die Jaffe-Reaktion.

Prinzip und Eigenschaften der Jaffe-Reaktion sind schon in Teil B, Abschnitt I. dargestellt worden. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei der Jaffe-Reaktion wie auch bei der TPB-Methode unter identischen Versuchsbedingungen, die in der Arbeitsvorschrift angegeben werden.

2. Das Ausschüttelverfahren mit Natriumtetraphenylborat (TPB) und nachfolgender Jaffe-Reaktion: TPB-Methode.

BEYERMANN gibt 1965 ein Ausschüttelverfahren zur Anreicherung von biogenen Aminen an. Der Autor zeigt in einer späteren Arbeit (BEYERMANN 1967), daß eine Modifikation dieses Verfahrens zur fast spezifischen Abtrennung von Kreatinin aus biologischem Material verwendet werden kann.

a) Die Tetraphenylboratextraktion.

Prinzip der Reaktion:

Kreatinin bildet mit Natriumtetraphenylborat (TPB) eine in Wasser schwer-, in Diäthyläther dagegen gut lösliche Verbindung. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um das Kreatinintetraphenylborat aus wäßriger Lösung durch Ausschütteln mit Äther in die Ätherphase zu überführen. Das Kreatinin kann im weiteren Analysengang aus der abgetrennten Ätherschicht quantitativ erfaßt werden.

Die Verteilung des Kreatinins:

Die Verteilung des Kreatinins zwischen Wasser- und Ätherphase ist von verschiedenen Parametern beeinflusst. Der Verteilungskoeffizient kann unter Verwendung von C^{14} -markiertem Kreatinin bestimmt werden. Man setzt definierten Konzentrationen von markiertem Kreatinin in wäßriger Lösung Natriumtetraphenylborat zu und schüttelt mit dem gleichen Volumen Diäthyläther. Nach der Trennung der beiden Phasen bestimmt man ihre Radioaktivität und berechnet den Verteilungskoeffizienten.

Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von pH-Wert, Zeit und Temperatur:

Kreatinin reagiert nur nach Anlagerung eines Protons mit Natriumtetraphenylborat. Der Verteilungskoeffizient wird deshalb mit steigender H-Ionenkonzentration größer. Sein Maximum liegt bei einem pH um 2,5. In stärker sauren Lösungen zersetzt sich das Reagenz, so daß schließlich keine extrahierbaren Kreatininverbindungen mehr vorliegen.

Bei einem pH-Wert von 2 ist das Verteilungsgleichgewicht nach einer Ausschüttelzeit von 10 Sekunden eingestellt. Unter gleichen Bedingungen beginnt die Zersetzung von Tetra-

phenyloborat nach etwa 5 Minuten. In Äther gelöstes Kreatinintetraphenyloborat wird beim Schütteln mit 2 n HCl in 10 Sekunden zerlegt. Kreatinin wird dabei in die salzsaure Phase überführt, das Reagenz und seine Zersetzungsprodukte bleiben vorwiegend im Äther gelöst.

Im Bereich von 0 bis 30° C ist der Verteilungskoeffizient praktisch von der Temperatur unabhängig.

Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von Fremdstoffen:

Fremdstoffe, die nicht mit Tetraphenyloborat reagieren, verbleiben in der wäßrigen Phase und beeinflussen die Kreatininverteilung auch in hohen Überschüssen nicht. Dazu gehören, - mit Ausnahme des Kalium- und Ammoniumions -, sämtliche anorganischen Bestandteile biologischen Materials, ferner die meisten neutralen und sauren Aminosäuren, Aminosucker, Harnsäure, Harnstoff, Purinderivate, Barbiturate und Sulfonamide, Guanidinessigsäure und Kreatinin. Zucker, niedere Fettsäuren und Oxy- und Ketokarbonsäuren, wie Aceton, Pyruvat, Ascorbinsäure, Ketoglutarinsäure und Oxaloesigsäure reagieren ebenfalls nicht mit Tetraphenyloborat. Zitronensäure, die im Analysengang als Puffersubstanz zugesetzt, und Trichloressigsäure, die zum Enteiweißen des Serums verwendet wird, stören die Extraktion nicht.

Kalium- und Ammoniumionen, Cholin und Acetylcholin bilden in Wasser schwerlösliche Tetraphenyloborate, die nicht mit Diäthyläther ausgeschüttelt werden. Diese Niederschläge flotieren an der Grenze von Wasser- und Ätherphase und können Kreatinin einschließen, was die Ausbeute beim Ausschütteln ungünstig beeinflusst. Die Störung kann man umgehen, wenn man die wäßrige Schicht nach dem Ausschütteln mit destilliertem Wasser überschichtet und den Niederschlag zusammen mit der Ätherschicht in 2 n HCl überführt. Dort werden die un-

löslichen Verbindungen zerstört und die eingeschlossenen Kreatininteilchen wieder in Freiheit gesetzt.

Zu den Stoffen, die mit Tetraphenylborat reagieren und gleichzeitig mit Äther ausgeschüttet werden, zählen biogene Amine, basische Aminosäuren, Oligopeptide, Alkaloide und Arzneimittel, die Stickstoffatome mit basischer Funktion tragen. Sie beeinflussen den Verteilungskoeffizienten des Kreatinins nur in biologisch nicht erreichbaren Konzentrationen, indem sie dem Kreatinin das Reagenz entziehen.

b) Photometrische Bestimmung des Kreatinins.

Die in Äther lösliche Verbindung von Kreatinin und Tetraphenylborat wird durch Schütteln mit Salzsäure aufgespalten. Das Kreatinin liegt nun fast ohne Begleitsubstanzen in der salzsauren Phase vor, in der es mit alkalischer Pikrinsäurelösung photometrisch bestimmt wird.

Abhängigkeit der Farbentwicklung von pH-Wert, Zeit und Temperatur.

Die neutrale Kreatininlösung entwickelt mit Pikrinsäure in alkalischem Milieu eine rote Färbung. Die Reaktion ist stark pH-abhängig. Zur Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 12.4 ± 0.1 dient ein Glycin-NaOH-Puffergemisch.

Die Farbentwicklung erreicht nach 5 Minuten 90%, nach 15 Minuten 100% ihres Maximalwertes, bleibt etwa 20 Minuten konstant und fällt dann langsam ab.

Die Extinktion des Reaktionsansatzes nimmt im Bereich von 0 bis 30°C um $1.2\%/^{\circ}\text{C}$ zu. Eichung und Analyse werden deshalb bei der gleichen Temperatur vorgenommen.

Einfluß von Fremdstoffen auf die photometrische Bestimmungsreaktion:

Mit Tetraphenylborat nicht reagierende Verbindungen werden im Analysengang der TPB-Extraktion vor der photometrischen Bestimmungsreaktion abgetrennt und können diese nicht mehr stören. Dazu gehören neutrale und saure Aminosäuren, niedere Fettsäuren, Oxy- und Ketokarbonsäuren, ferner einige Arzneimittel wie Aspirin, Cardiazol, Eleudron, Conteben und Phenacetin. Substanzen wie Kongorot, Bromsulfophthalein, Lactoflavin, Furadantin, Bilirubin, die durch ihre Eigenfärbung stören, finden sich ebenfalls in dieser Gruppe.

Mit Tetraphenylborat in Äther ausschüttelbare Verbindungen oder die bis zum Ende des Analysenganges mitgeführten schwerlöslichen TPB-Niederschläge können bei der photometrischen Messung zu verschiedenartigen Störungen führen:

1) Biogene Amine, basische Aminosäuren, Alkaloide und Arzneimittel, die Stickstoffgruppen mit basischer Funktion enthalten, fallen bei hohen Konzentrationen als schwerlösliche Pikrate aus. Die daraus resultierende Trübung verfälscht das photometrische Meßergebnis, kann aber durch Filtration des Reaktionsansatzes beseitigt werden.

2) Einige der mit Tetraphenylborat ausgeschüttelten Verbindungen geben mit Pikrinsäure in verschiedenem Ausmaß eine Farbreaktion, die der des Kreatinins ähnelt. Die Störgröße ist aber bei diesen Substanzen im allgemeinen so gering, daß sie vernachlässigt werden kann. Die einzige beachtenswerte Ausnahme bildet Glycocyamidin, das in gleicher Konzentration wie Kreatinin eine etwa halb so große Farbentwicklung zeigt (MAW). Der Verteilungskoeffizient beträgt unter den Bedingungen der Kreatininextraktion 10 gegenüber einem Wert von 15 für Kreatinin. Da das Verhältnis Kreatinin zu Glycocyamidin im Serum mit 6:1 angegeben wird (KOSTIR u. PRISTOUPIL), ist die Störmöglichkeit von Glycocyamidin begrenzt.

- c) Vergleich der Tetraphenylborat-Methode mit dem Fullererde-Verfahren.

28 Serumproben wurden zusätzlich zur Tetraphenylborat-Methode noch mit dem Fullererde-Verfahren (Lloyd's Reagenz) in der Modifikation von OWEN u. Mitarb. analysiert, das ebenso wie die TPB-Methode als spezifisch für Kreatinin gilt. In Abb.2 sind die am gleichen Serum mit der Tetraphenylborat-Methode ermittelten Werte auf der y-Achse und die mittels des Fullererde-Verfahrens gemessenen Kreatinin-konzentrationen auf der x-Achse eingetragen. (Die mit dem Fullererde-Verfahren gefundenen Werte verdanke ich Herrn Dozent Dr. Beyermann). Die Punkte streuen innerhalb der für jedes Verfahren eingetragenen Standardabweichungen um die 45°-Gerade. Beide Methoden liefern also identische Werte.

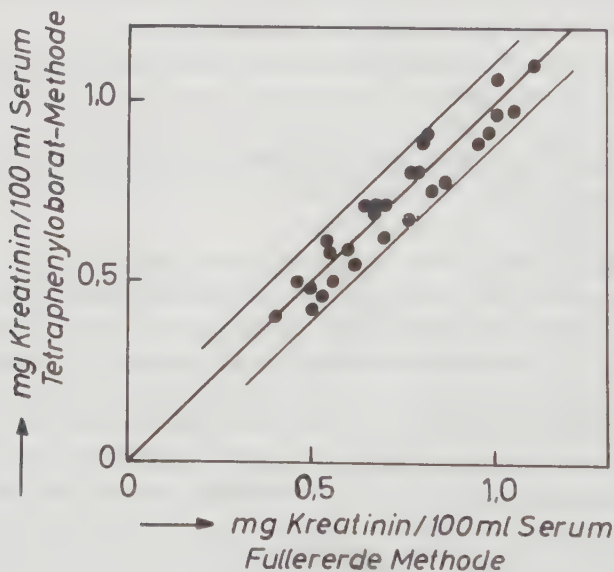


Abb.2 : Tetraphenylborat-Methode in Abhängigkeit von dem Fullererde-Verfahren.

3. Arbeitsvorschrift.

Reagentien:

Trichloressigsäure (20% in Wasser gelöst)

2 n HCl

4 n NaOH

Methylrot (0.01% in Wasser gelöst)

Pikrinsäure (1% in Wasser gelöst)

NaOH-Glycin-Puffer (1 g NaOH und 0.2 g Glycin/100 ml Wasser)

Pikrinsäure-Puffergemisch (Gleiche Teile Pikrinsäurelösung
und NaOH-Glycin-Puffer. Täglich
frisch ansetzen).

Citronensäure (fest)

Natriumtetraphenylborat (fest)

Diäthyläther

Enteiweißen:

Zu 3.0 ml Serum werden in einem Zentrifugenglas unter gleichzeitigem Umrühren mit einem Glasstab 3.0 ml 20% Trichloressigsäure zugesetzt. Man läßt das ausgefällte Eiweiß 10 Minuten stehen und zentrifugiert dann etwa 3 Minuten bei 3000 U.p.m. Der Überstand wird dekantiert und von letzten kleinen Eiweißflocken befreit, indem man ihn mittels einer Wasserstrahlpumpe über ein Membranfilter (30 mm Durchmesser, Membranfiltergesellschaft Göttingen) in ein Schliffreagenzglas (140 mm lang, 16 mm Durchmesser mit NS-14.5-Schliffhülse) absaugt. Der Rückstand im Zentrifugenglas wird mit 2.0 ml Trichloressigsäure durch Aufwirbeln mit einem Glasstab nachgewaschen, zentrifugiert und ebenfalls über das Membranfilter abgesaugt. Auf eventuelles Aufschäumen des Filtrates muß geachtet werden.

Filtrat:

Das saure Filtrat wird 4 n NaOH tropfenweise gegen Methylrot neutralisiert und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10.0 ml aufgefüllt.

Jaffe-Reaktion:

Man pipettiert 4.0 ml des neutralen Filtrates in ein Reagenzglas und vermischt die Lösung mit 5.0 ml Pikrinsäure-Puffergemisch. Da dabei oft Trübungen des Reaktionsansatzes auftreten, wird erneut über ein Membranfilter abgesaugt. Das klare Reaktionsprodukt aus Serumfiltrat und Pikrinsäure-Puffergemisch wird genau 15 Minuten nach dem Zusatz der Pikrinsäure in 5 cm Küvetten bei einer Wellenlänge von 530 nm gegen eine Vergleichsküvette mit Wasser photometriert.

TPB-Extraktion:

Den im Schliffreagenzglas verbliebenen 6.0 ml des neutralen Serumfiltrates werden etwa 50 mg feste Citronensäure zugefügt, um einen für die TPB-Extraktion optimalen pH-Wert von 2.5 ± 0.2 einzustellen. (Die Dosierung erfolgt mit Glaslöffeln bekannten Fassungsvermögens). Danach setzt man 400 ± 50 mg festes Natriumtetraphenylborat und 6.0 ml Diäthyläther zu, verschließt das Reagenzglas mit einem Schliffstopfen und schüttelt 15 Sekunden. Nach dieser Schüttelzeit sind 94% des vorhandenen Kreatinins in der Ätherschicht als Tetraphenylborat gelöst. Die Ätherphase wird mit Hilfe einer Übersaugvorrichtung in ein zweites Schliffreagenzglas überführt, das schon vorher mit 2.0 ml 2 n HCl beschickt worden ist. Der Inhalt des ersten Schliffglases wird nochmals mit 2 ml Äther einige Sekunden lang ausgeschüttelt. Die ausgeschüttelte wäßrige Phase überschichtet man vorsichtig mit destilliertem Wasser. Der an der Phasengrenze von Wasser und Äther flottierende weiße Niederschlag wird nun

zusammen mit dem Äther ebenfalls in das zweite Schliffreagenzglas gesaugt. Damit ist das Kreatinin von seinen Begleitstoffen im Serumfiltrat abgetrennt.

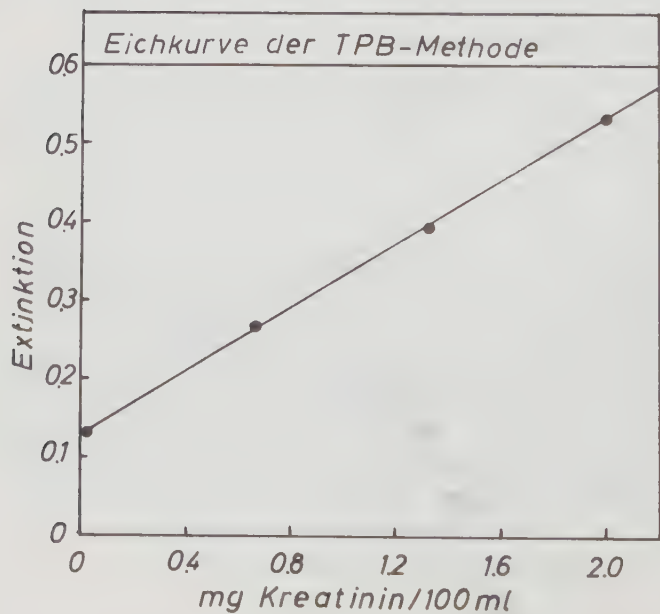
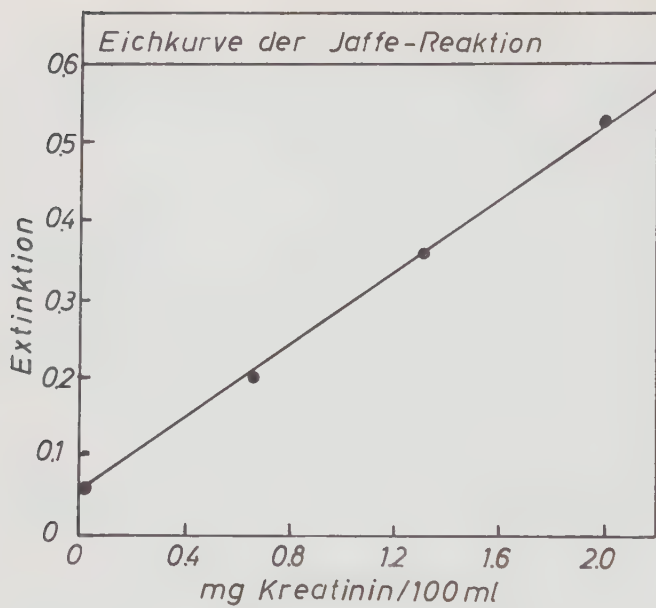
Der Inhalt des zweiten Schliffglases wird wiederum 15 Sekunden geschüttelt, wodurch das gesamte Kreatinin aus der Ätherschicht in die Salzsäure überführt wird. Der nur noch Zersetzungsprodukte des Tetraphenylborates enthaltende Äther wird abgetrennt und verworfen. Die salzsaure Phase schüttelt man noch zweimal mit etwa 5.0 ml frischen Äthers, um Reste von Tetraphenylborat weitgehend zu entfernen. Auch diese Ätherextrakte werden verworfen.

Die salzsaure Phase bringt man 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad, um Ätherreste zu entfernen. Anschließend neutralisiert man den Reagenzglasinhalt tropfenweise mit 4 n NaOH, wobei ein Tropfen einer 0.01prozentigen Methylrotlösung als Indikator dient. Die abgekühlte, neutrale Lösung wird mit 5.0 ml Pikrinsäure-Puffergemisch versetzt, auf 10.0 ml aufgefüllt und wegen eventuell auftretender Trübung durch ein Membranfilter filtriert.

Die spektrophotometrische Messung erfolgt in der gleichen Weise, wie es in der Arbeitsvorschrift für die Jaffe-Reaktion angegeben ist.

Eichkurven:

Zur Auswertung der im Spektrophotometer abgelesenen Extinktionen werden für beide Methoden Eichkurven angelegt. Zur Gewinnung der Eichwerte werden die Analysengänge in der vorgeschriebenen Weise durchgeführt, wobei man die Serumproben durch definierte Kreatininkonzentrationen ersetzt. Jeder Kurvenpunkt stellt den Mittelwert von etwa zwanzig Einzelmessungen dar. Wegen möglicher Veränderung der Reagentien wird die Eichkurve täglich überprüft. Da das Lambert-Beersche Gesetz bis in hohe Konzentrationsbereiche gilt, liest man hohe Kreatininwerte durch Extrapolieren ab.



Methodischer Fehler:

Die Bestimmung des methodischen Fehlers der Jaffe-Reaktion und der Tetraphenylborat-Methode wurde für jede Methode einzeln durchgeführt. Ein aus Serumproben verschiedener Patienten gewonnenes Mischserum wurde wiederholt analysiert. Aus achtzehn Bestimmungen am gleichen Sammelserum wurden die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für beide Methoden errechnet und miteinander verglichen.

	Jaffe-Reaktion	TPB-Methode
n	18	18
$\bar{x}$	1.09	0.84
s	0.041	0.048
v	3.76	5.72
n: Anzahl der Messungen $\bar{x}$: Mittelwert der Einzelmessungen s: Standardabweichung (mg/100 ml) v: Variationskoeffizient (%)		

Tab.1 : Vergleich von Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Jaffe-Reaktion und der Tetraphenylborat-Methode.

Erwartungsgemäß weist die Tetraphenylborat-Methode den größeren Fehler auf, da die gegenüber der Jaffe-Reaktion vermehrten Reaktionsschritte zusätzliche Fehlerquellen darstellen.

C. M a t h e m a t i s c h - s t a t i s t i s c h e M e t h o d i k

Die mathematisch-statistischen Grundlagen der zur Auswertung der Meßergebnisse benutzten statistischen Methoden sollen im folgenden dargestellt werden. Es wurden verwendet:

I. Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

II. Der t-Test.

III. Die Korrelations- und Regressionsrechnung.

I. Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

Die Summe der quadratischen Abweichungen der Einzelwerte einer Reihe von Beobachtungen $x_1, x_2, \dots, x_n$ von ihrem arithmetischen Mittel $\bar{x}$ dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade $n-1$ bezeichnet man als Varianz s^2 . Sie errechnet sich nach der Formel:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Wenn die Varianz nicht mit anderen Varianzen verglichen werden kann, ist sie kein geeignetes Maß zur direkten Schätzung der Streuung, da in ihr nicht die einfachen Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert verarbeitet sind, sondern deren Quadrate. Man zieht darum die Wurzel aus s^2 und gelangt so zu Standardabweichung s .

Will man die Standardabweichungen mehrerer Reihen von Beobachtungen miteinander vergleichen, die unterschiedliche Mittelwerte aufweisen, so ist es zweckmäßig, den Variationskoeffizienten v zu verwenden.

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad [\%]$$

Er ergibt sich aus dem Hundertfachen der Standardabweichung dividiert durch den zugehörigen Mittelwert.

II. Der t-Test.

Die Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ zweier Stichproben mit n_1 bzw. n_2 Beobachtungen sollen miteinander verglichen werden. Weichen die Mittelwerte voneinander ab, so kann ihre Differenz bei identischen wahren Mittelwerten (Nullhypothese) zufallsbedingt sein oder auf einem echten Unterschied beruhen. Trifft die Nullhypothese nicht zu, dann ist es wahrscheinlich, daß die Unterschiede zwischen den Stichproben einen signifikanten Wert überschreiten, der von der Variabilität beider Merkmale, vom Stichprobenumfang n und vom gewählten Signifikanzniveau abhängt. Die Berechnung der Signifikanzschwelle erfolgt mit dem t-Test:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

Als Maß für die Variabilität beider Stichproben zusammen errechnet sich die Größe s nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{1i} - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Liegen gepaarte Beobachtungen vor, so kann das arithmetische Mittel der Differenzen der Meßwerte mit Hilfe des "t-Testes bei paarweiser Anordnung" auf signifikante Abweichung von Null geprüft werden.

$$t = \frac{\bar{d}}{s_{\bar{d}}}$$

Es gehen folgende Größen in die Gleichung ein: Mittelwert der Differenzen d_i :

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i$$

Standardabweichung der Differenzen d_i : $s_d = \sqrt{s_d^2}$

Varianz der Differenzen d_i :

$$s_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n - 1} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n d_i)^2}{n}}{n - 1}$$

Standardabweichung des Mittelwertes der Differenzen d_i :

$$s_{\bar{d}} = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

Zahl der Beobachtungspaare: n ; Freiheitsgrad: $n - 1$

III. Korrelations- und Regressionsrechnung.

Mit der Korrelations- und Regressionsrechnung läßt sich der Zusammenhang zweier oder mehrerer Merkmale beschreiben. Betrachtet man zum Beispiel zwei Reihen von Merkmalen oder Meßgrößen, die als $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ und $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$ bezeichnet seien, so sind folgende Beziehungen denkbar:

a) Ein streng gesetzmäßiger Zusammenhang im Sinne einer mathematischen Funktion, durch welche bei bekanntem Merkmal x oder y der zugehörige Wert eindeutig bestimmt ist.

b) Die rein zufällige Beziehung zwischen x und y . Man spricht in diesem Fall von einem aleatorischen Zusammenhang. Beim Eintragen der x - und y -Werte erhalten wir einen Punktschwarm ohne Richtungstendenz.

c) Betrachtet man die beiden Fälle als Extreme, so liegt zwischen ihnen eine Vielzahl von Beziehungen, in denen sowohl funktionale als auch aleatorische Komponenten enthalten sind. Die in der Medizin häufig vorkommende Kombination von funktionalem und aleatorischem Zusammenhang wird als stochastischer bezeichnet.

Bestehen korrelative Zusammenhänge zwischen den Größen x und y , so lassen sich wenigstens drei Typen von Abhängigkeitsverhältnissen unterscheiden, deren rechnerische Behandlung indes völlig übereinstimmen.

a) Einseitige Abhängigkeit: x ist sachliche Ursache von y . Dabei kann x entweder die einzige Ursache sein oder auch nur einer von vielen Einflußfaktoren.

b) Wechselseitige Abhängigkeit: x kann sachliche Ursache von y , aber auch y Ursache von x sein.

c) Gemeinsamkeitskorrelation: x und y haben keine direkte kausale Beziehung zueinander. Der Zusammenhang entsteht dabei durch das Einwirken dritter Größen gemeinsam auf x und y .

Der statistische Gesichtspunkt bei Korrelationsproblemen ergibt sich daraus, daß eines, mehrere oder alle Merkmale der Zufallsvariabilität unterworfen sind. Die Maßzahl für die Intensität des Zusammenhangs einer linearen stochastischen Beziehung zwischen zwei Wertereihen x und y ist der lineare Korrelationskoeffizient r . Er kann mit seinem absoluten Wert zwischen den Extremen 0 und 1 liegen. Der Wert 0 bedeutet, daß kein bzw. kein linearer Zusammenhang vorliegt. Der Wert 1 zeigt eine funktionelle mathematische Abhängigkeit der korrelierten Merkmale an. Je größer also der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten wird, um so straffer ist der Zusammenhang. Ein positiver Korrelationskoeffizient bedeutet, daß mit wachsendem x auch y im Durchschnitt zunimmt. Umgekehrtes Verhalten stellen wir bei negativem Korrelationskoeffizienten fest, wenn mit wachsendem x der Wert y im Durchschnitt abnimmt. Die Merkmale variieren dann gegenläufig.

Bei der Signifikanzprüfung eines Korrelationskoeffizienten wird die Gruppe, in der er errechnet wurde, als zufällige Stichprobe aus einer Grundgesamtheit mit einem Korrelationskoeffizienten von Null betrachtet. Ist die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen dieser Nullhypothese klein, so kann sie verworfen werden. Der Zusammenhang, den der Korrelationskoeffizient beschreibt, ist dann signifikant oder statistisch gesichert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit beim Verwerfen der Nullhypothese höchstens 1% ($p=0.01$) beträgt.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgt nach der Methode von BRAVAIS und PEARSON. Die vereinfachte Formel lautet:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

Dabei bedeutet $S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ die Summe der Abweichungsprodukte der Einzelwerte von den Mittelwerten x und y . $S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$ und $S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ stellen entsprechend die Summe der Abweichungsquadrate der Einzelwerte vom Mittelwert dar.

Es sei angenommen, daß zwischen x und y ein statistisch gesicherter Zusammenhang besteht. Man kann nun die Abhängigkeit der y -Werte von x in einer Regressionsgleichung ausdrücken. Die Berechnung erfolgt nach der Methode der kleinsten Quadrate. Dabei ist derjenige Verlauf der Geraden der wahrscheinlichste, bei dem die Summe der Quadrate den Abweichungen der beobachteten Werte von den unbekannten wahren Werten ein Minimum wird.

Die Gerade habe die Gleichung $y = a + bx$. Durch a und b wird für jedes x der Wert des zugehörigen y bestimmt. Bezeichnet man die beobachteten Werte von y und die auf der angenommenen unbekannten Geraden liegenden Werte mit y_R , so bestimmt man a und b derart, daß die Summe der Abweichungsquadrate vom wahren Wert $Z = \sum_{i=1}^n (y_i - y_R)^2$ ein Minimum wird. Durch partielles Differenzieren nach a bzw. b und Vereinfachen der Gleichung erhält man:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{und} \quad b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Der Ausdruck b wird als Regressionskoeffizient bezeichnet. Analog können die Konstanten a' und b' ermittelt werden, die die Regression von y auf x beschreiben.

Die beiden Regressionsgeraden $y=f(x)$ und $x=f(y)$ lauten also:

$$y_R = bx + a \quad \text{und} \quad x_R = b'y + a'$$

Der Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden liegt im sogenannten Schwerpunkt mit den Koordinaten $\bar{x}$ und $\bar{y}$.

Der Vergleich zweier Steigungen (Regressionskoeffizienten) b_1 und b_2 der Regressionsgeraden y_{R1} und y_{R2} wird mit Hilfe des t-Testes vorgenommen.

Es gilt die Formel:
$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{s_d}$$

Dabei bedeutet:

$$s_d^2 = \left[\frac{\left(S_{(yy)_1} - \frac{(S_{(xy)_1})^2}{S_{(xx)_1}} \right) + \left(S_{(yy)_2} - \frac{(S_{(xy)_2})^2}{S_{(xx)_2}} \right)}{n_1 + n_2 - 4} \right] \left[\frac{1}{S_{(xx)_1}} + \frac{1}{S_{(xx)_2}} \right]$$

Falls eine Steigung b_0 von einer Geraden stammt, die nicht mit einer Streuung behaftet ist, vereinfacht sich die Formel zu:

$$t = \frac{|b - b_0| \sqrt{S_{xx}}}{\sqrt{\frac{S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}}{n - 2}}}$$

Anmerkung: Zur Ausarbeitung dieses Kapitels wurden die Lehrbücher von CAVALLI-SFORZA, FREUDENBERG, HASELOFF-HOFFMANN und WEBER benutzt.

D. E r g e b n i s s e.

I. Übersicht.

Der Kreatiningehalt von 579 Serumproben eines nicht ausgewählten Patientengutes wurde mit zwei unterschiedlichen Analysenverfahren bestimmt.

Die untersuchten Fälle waren aufgegliedert in 235 weibliche und 281 männliche Patienten mit Erkrankungen ohne wahrscheinlichen Einfluß auf den Serumkreatininspiegel im Sinne einer Kreatininretention infolge eingeschränkter Nierenfunktion. Der Kreatiningehalt im Serum dieser beiden Gruppen wird in unserer Untersuchung als "nicht pathologisch" angesehen und als "normal" bezeichnet. Die Versuchspersonen gelten als nierengesund. Alle Einzelmessungen lagen dabei unter dem von HENRY angegebenen Grenzwert des Normalbereichs, der für männliche Individuen 1.4 mg/100 ml, für weibliche 1.2 mg/100 ml beträgt. Bei 47 Patienten, 23 weiblichen und 24 männlichen, wurde die Kreatininkonzentration im Serum in im Einzelfall wechselnden zeitlichen Abständen ein zweites Mal bestimmt.

Eine dritte Gruppe von 7 männlichen und 9 weiblichen Patienten zeigte Kreatininwerte im Serum, die über den Grenzwerten von 1.4 bzw. 1.2 mg/100 ml lagen und teilweise 12 mg/100 ml erreichten. In 14 Fällen wurde die Diagnose einer reduzierten Nierenfunktion gestellt. In 2 Fällen von Herzinsuffizienz fanden wir Kreatininkonzentrationen zwischen 1.5 und 2.0 mg/100 ml. Die Kreatininwerte dieser Gruppe von 16 Versuchspersonen wurden im Einklang mit den klinischen Diagnosen als "pathologisch" eingestuft. Eine Übersicht über die Meßergebnisse vermittelt Tab. 2. Die Häufigkeitsverteilung der normalen und pathologischen Kreatininwerte wird für beide Methoden in Abb.3 bis Abb.8 graphisch dargestellt.

Diagnose	Versuchspersonen		Mittlerer Kreatinin-gehalt (mg/ 100 ml)		Mittlere Differenz zwischen beiden Methoden (mg/ 100 ml)
	Gruppe	Anzahl	J	TPB	J - TPB
Normale Nierenfunktion	weiblich (w)	235	0.75 s=0.14	0.60 s=0.14	0.15 s=0.073
	männlich (m)	281	0.89 s=0.17	0.72 s=0.16	0.17 s=0.075
Patholog. Nierenfunktion	weiblich und männlich (p)	16	4.55 s=0.36	4.23 s=0.35	0.32 s=0.12
s : Standardabweichung J : Jaffe-Reaktion TPB: Tetraphenylborat-Methode					

Tab.2: Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse der Kreatininbestimmung an 532 Versuchspersonen mit der Jaffe-Reaktion und der Tetraphenylborat-Methode.

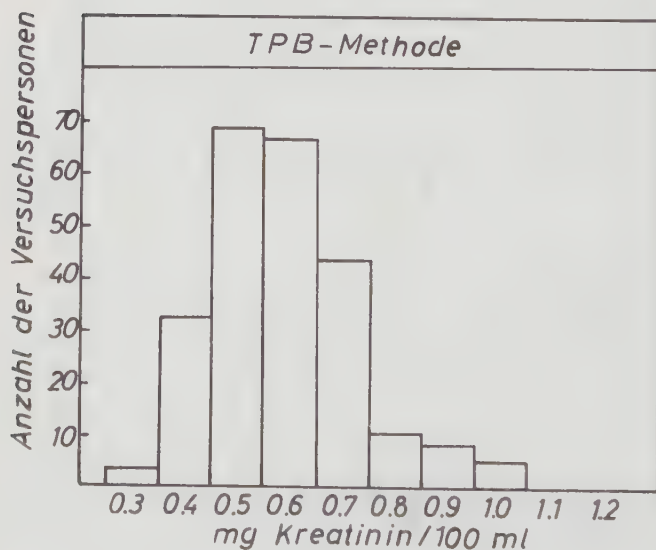
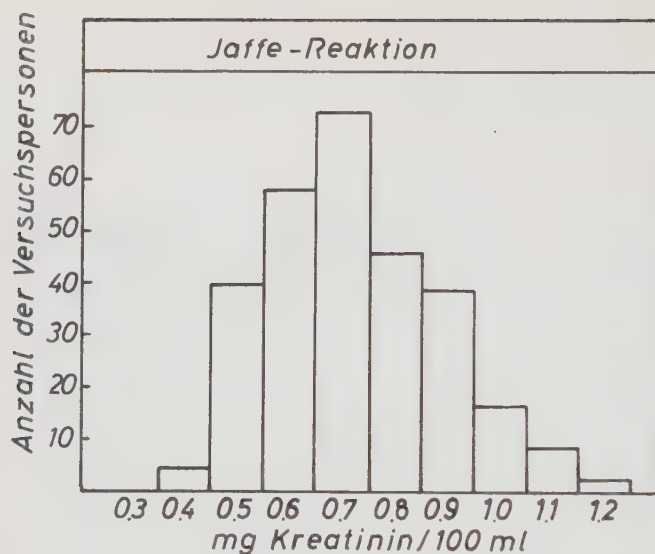


Abb.3 und 4: Häufigkeitsverteilung der Kreatininkonzentrationen im Serum von 235 nieren-gesunden Frauen, gemessen mit der Jaffe-Re-aktion und der Tetraphenylborat(TPB)-Methode.

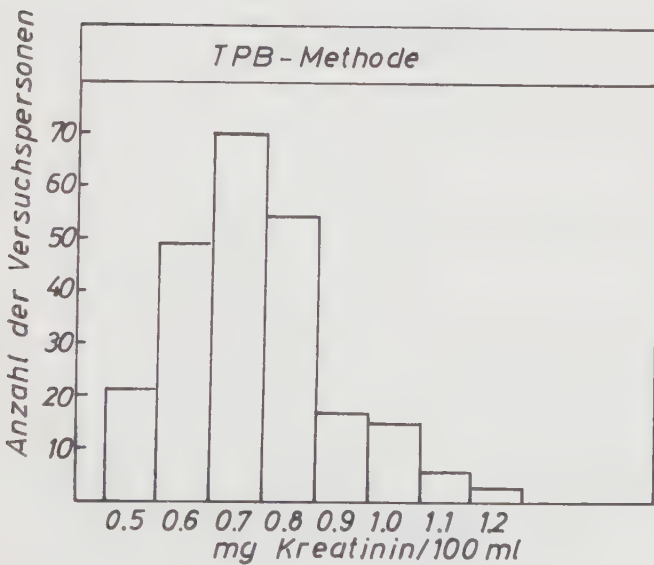
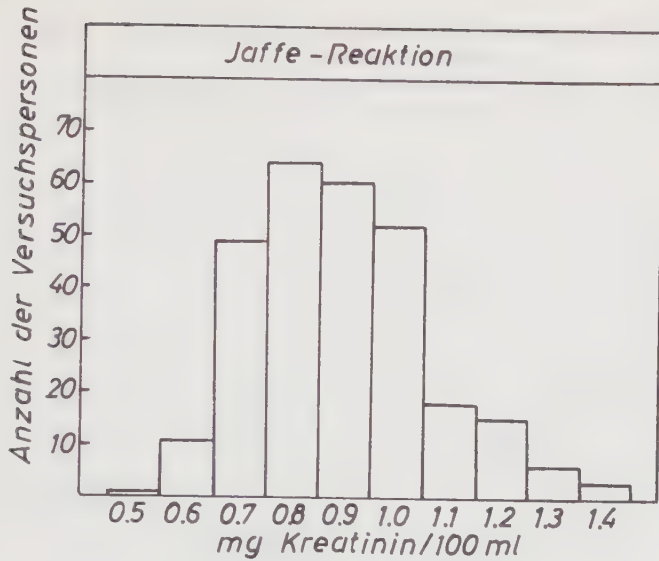


Abb.5 und 6: Häufigkeitsverteilung der Kreatininkonzentrationen im Serum von 281 nieren-gesunden Männern, gemessen mit der Jaffe-Re-aktion und der Tetraphenylborat(TPB)-Methode.

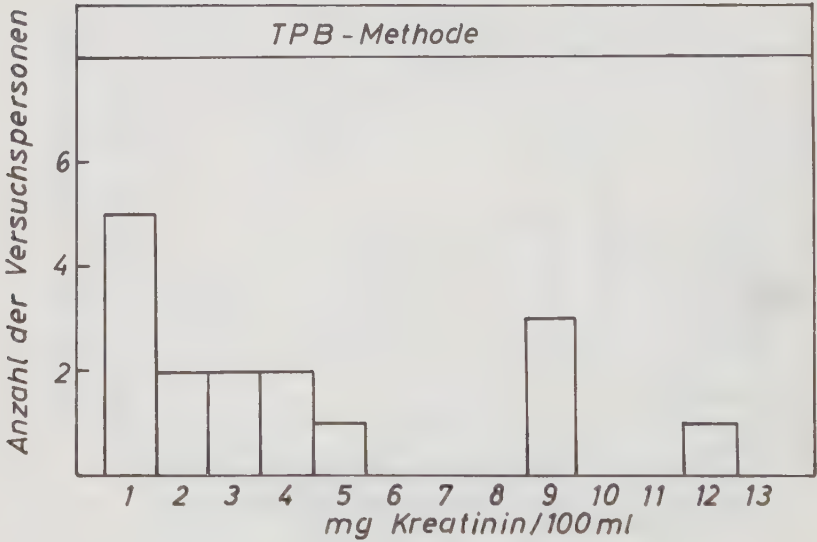
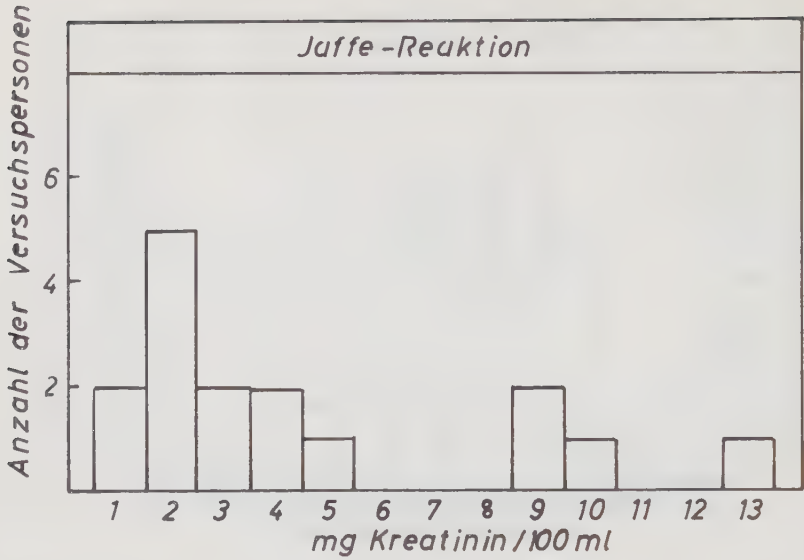


Abb.7 und 8: Häufigkeitsverteilung der Kreatininkonzentrationen im Serum von 16 nierenkranken Frauen und Männern, gemessen mit der Jaffe-Reaktion und der Tetraphenylborat(TPB)-Methode.

II. Mathematisch-statistische Auswertung.

1. Vergleich der Meßergebnisse.

Für 235 weibliche (Gruppe w) und 281 männliche (Gruppe m) Versuchspersonen mit Serumkreatininwerten im Normalbereich und für 16 Probanden mit pathologischer Nierenfunktion (Gruppe p) wurden jeweils die Standardabweichungen der mit der Jaffe-Reaktion und der mit der TPB-Methode ermittelten Kreatininkonzentration errechnet. Außerdem bestimmten wir die Standardabweichungen für die Differenzen beider Methoden. Sämtliche Standardabweichungen sind in Tab.2 eingetragen.

Die in Tab.2 aufgeführten Meßergebnisse für die Gruppen (w), (m) und (p) wurden in verschiedenen Beziehungen auf statistisch signifikante oder nicht gesicherte Unterschiede geprüft. Mit Hilfe des t-Testes wurden verglichen:

- a) Die Mittelwerte der Kreatininkonzentration zwischen beiden Methoden für die Gruppen (w), (m) und (p),
- b) für jede der beiden Methoden die Mittelwerte der Kreatininkonzentration zwischen den Gruppen (w), (m) und (p),
- c) die Mittelwerte der Differenzen aus beiden Methoden für die Gruppen (w), (m) und (p) untereinander. Dabei wurden die Beziehungen der Gruppen (m) zu (w), (w) zu (p) und (m) zu (p) untersucht.

Zur Sicherung einer signifikanten Abweichung der Mittelwerte der Differenzen beider Methoden von Null verwendeten wir für die Gruppen (w), (m) und (p) den t-Test bei paarweiser Anordnung.

Bei allen genannten Vergleichen sind die getesteten Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.01$ statistisch gesichert. Die Signifikanzprüfungen sind in Tab.3 zusammengefaßt.

Vergleich zwischen	Verglichene Gruppen	Signifikanz
den Mittelwerten der Methoden J und TPB bei den Gruppen (w), (m), (p)	$(w)_J$ und $(w)_{TPB}$ $(m)_J$ und $(m)_{TPB}$ $(p)_J$ und $(p)_{TPB}$	 + + +
den Mittelwerten der Gruppen (w), (m), (p) bei den Methoden J und TPB	$(w)_J$ und $(m)_J$ $(w)_{TPB}$ und $(m)_{TPB}$ $(w)_J$ und $(p)_J$ $(w)_{TPB}$ und $(p)_{TPB}$ $(m)_J$ und $(p)_J$ $(m)_{TPB}$ und $(p)_{TPB}$	 + + + + + +
den Mittelwerten der Differenzen J-TPB der Methoden J und TPB bei den Gruppen (w), (m), (p)	$(w)_{J-TPB}$ und $(m)_{J-TPB}$ $(w)_{J-TPB}$ und $(p)_{J-TPB}$ $(m)_{J-TPB}$ und $(p)_{J-TPB}$	 + + +
Abweichung des Mittelwertes der Differenzen J-TPB von Null bei den Gruppen (w), (m), (p)	$(w)_{J-TPB}$ $(m)_{J-TPB}$ $(p)_{J-TPB}$	 + + +
J : Jaffe-Reaktion TPB : Tetraphenylborat-Methode + : Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$		

Tab. 2: Zusammenstellung von Signifikanzprüfungen. Vergleich der in Tab. 2 aufgeführten Meßergebnisse der Kreatininbestimmung im Serum von 532 Versuchspersonen.

2. Zusammenhang zwischen Jaffe-Reaktion und TPB-Methode.

Die Differenz beider Methoden repräsentiert eine Vielzahl von Stoffen, die wir als Nichtkreatininchromogene bezeichnet haben. Um die Art der Beziehung von Kreatinin und Nichtkreatininchromogenen in verschiedenen Konzentrationsbereichen und unterschiedlichen Kollektiven zu klären, wurde anhand von Stichproben aus dem beschriebenen Untersuchungsmaterial für die einzelnen Gruppen von Versuchspersonen eine Korrelations- und Regressionsrechnung durchgeführt. Die Meßwerte der Jaffe-Reaktion und der Tetraphenylloborat-Methode wurden in zwei verschiedenen Abhängigkeiten auf den zwischen ihnen bestehenden Zusammenhang geprüft.

a) $J=f(TPB)$: Direkte Jaffe-Reaktion (J ; y-Achse) in Abhängigkeit von der Tetraphenylloborat-Methode (TPB ; x-Achse).

Bei der Wahl dieser Koordinaten schließt man von der TPB-Methode, die den "wahren Kreatininwert liefert, auf die Jaffe-Reaktion, bei der noch zusätzliche variable Faktoren die Kreatininkonzentration im Sinne zu hoher Werte verfälschen. Würden mit beiden Methoden identische Kreatininwerte gemessen, so lägen die Kurvenpunkte auf der Geraden $y=x$. Mit Hilfe des t-Testes kann nun durch Vergleich des Regressionskoeffizienten (Steigung) einer Regressionsgerade y_R mit der Steigung der 45° -Geraden $y=x$ geprüft werden, ob die genannten Geraden parallel verlaufen oder ob sie in ihren Steigungen voneinander abweichen. Es zeigte sich, daß der Unterschied der beiden Geraden für alle Gruppen von Versuchspersonen mit normalen Kreatininwerten (Regressionslinien $y_{R(w)}$, $y_{R(m)}$, $y_{R(w+m)}$) statistisch nicht gesichert ist (Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0.05$), was Parallelität der Regressionsgeraden zur Geraden $y=x$ bedeutet. Auf gleiche Weise wurden die Regressionskoeffizienten der Gruppen mit normalem Kreatiningehalt untereinander verglichen, die, wie

man schon aus vorstehendem Befund abschätzen kann, ebenfalls keine signifikanten Differenzen aufweisen.

Für die Patientengruppe mit pathologischen Kreatininwerten ist die Abweichung der Regressionsgerade $y_{R(p)}$ von der 45°-Geraden $y=x$ statistisch auffällig ($p < 0.05$). Dagegen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Regressionslinien $y_{R(w)}$, $y_{R(m)}$ und $y_{R(w+m)}$ für Normalwerte und $y_{R(p)}$ für pathologische Werte nicht nachgewiesen werden.

Die Regressionsgerade $y_{R(w+m+p)}$ für die aus Normalwerten und pathologischen Werten zusammengefaßte Gruppe weicht signifikant ($p < 0.01$) von der Geraden $y=x$ ab. Dieser Befund erklärt sich dadurch, daß der Mittelwert der Differenzen bei der Methoden bei den pathologischen Kreatininwerten größer ist als bei den normalen. Verbindet man den Schnittpunkt der Regressionsgeraden $y_{R(w+m)}$ und $x_{R(w+m)}$ für den Normalbereich mit dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden $y_{R(p)}$ und $x_{R(p)}$ für den pathologischen Bereich, so zeigt die resultierende Gerade eine größere Divergenz zur Geraden $y=x$ als jede der beiden Geraden $y_{R(w+m)}$ und $y_{R(p)}$ für sich allein. Die Abweichung der Geraden $y_{R(w+m+p)}$ von den Regressionslinien $y_{R(p)}$ und $y_{R(w+m)}$ jedoch ist statistisch nicht gesichert.

Die Korrelationskoeffizienten liegen bei den einzelnen Gruppen zwischen 0.940 und 0.999. Dies zeigt deutlich den ausgesprochen straffen Zusammenhang zwischen den Variablen J und TPB.

b) $J - TPB = f(TPB)$: Differenz zwischen Jaffe-Reaktion und Tetraphenylborat-Methode ($J - TPB$; y-Achse) als Funktion der Tetraphenylborat-Methode (TPB; x-Achse).

Die Differenz $J - TPB$ bedeutet anschaulich den Gehalt des Serums an Nichtkreatininchromogenen. Diese werden also in

funktionelle Abhängigkeit von der mit der Tetraphenylloborat-Methode ermittelten "wahren Kreatininkonzentration" gebracht. Es wurden wiederum Regressionskoeffizienten und -geraden bestimmt und untereinander und mit der Geraden $y=0$ (x-Achse) verglichen. Die Resultate stimmen mit den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Signifikanzprüfungen bei sich entsprechenden Vergleichen völlig überein.

Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden für normale Kreatininwerte liegen bei allen entsprechenden Gruppen unter 0.1 und zeigen an, daß im Normalbereich praktisch kein Zusammenhang zwischen Kreatiningehalt und Konzentration der Nichtkreatininchromogene besteht, sondern daß beide unabhängig voneinander variieren. Dagegen ist der Korrelationskoeffizient für die Geraden $y_{R(p)}/x_{R(p)}$ statistisch auffällig ($p < 0.05$) und für die Regressionslinien $y_{R(w+m+p)}/x_{R(w+m+p)}$ statistisch gesichert ($p < 0.01$). Im Bereich pathologischer Kreatininkonzentrationen besteht also ein auffällig enger Zusammennang zwischen den Variablen J - TPB und TPB. Der Korrelationskoeffizient besitzt positives Vorzeichen, das den Anstieg der Größe J - TPB mit zunehmendem Wert von TPB verdeutlicht.

Die Gleichungen der Regressionsgeraden und die Korrelationskoeffizienten können Tab.4 entnommen werden. Die Signifikanzprüfungen zum Vergleich der einzelnen Regressionskoeffizienten untereinander und mit den Geraden $y=x$ bzw. $y=0$ sind in Tab.5 aufgeführt. In Abb.9 bis 16 sind die Regressionsgeraden und die zu ihrer Berechnung benutzten Meßwerte graphisch dargestellt.

Gruppe		Regressionsgerade	
		Funktionelle Abhängigkeit $y=f(x)$	
		$J=f(TPB)$	$J-TPB=f(TPB)$
Normale Kreatininwerte	weiblich (w)	$y_R = 0.977 x + 0.171$ $x_R = 0.932 y - 0.109$ $r = 0.940$	$y_R = -0.023 x + 0.171$ $x_R = -0.246 y + 0.607$ $r = -0.076$
	männlich (m)	$y_R = 1.014 x + 0.180$ $x_R = 0.884 y - 0.092$ $r = 0.946$	$y_R = 0.014 x + 0.180$ $x_R = 0.113 y + 0.622$ $r = 0.040$
	weiblich und männlich (w+m)	$y_R = 1.022 x + 0.160$ $x_R = 0.886 y - 0.085$ $r = 0.962$	$y_R = 0.022 x + 0.160$ $x_R = 0.199 y + 0.570$ $r = 0.066$
Patholog. Kreatininwerte	weiblich und männlich (p)	$y_R = 1.018 x + 0.241$ $x_R = 0.982 y - 0.225$ $r = 0.999$	$y_R = 0.018 x + 0.241$ $x_R = 15.52 y - 0.679$ $r = 0.527$
Normale u. patholog. Kreatininwerte	weiblich und männlich (w+m+p)	$y_R = 1.028 x + 0.167$ $x_R = 0.972 y - 0.161$ $r = 0.999$	$y_R = 0.028 x + 0.167$ $x_R = 17.05 y - 2.047$ $r = 0.691$
r = Korrelationskoeffizient J = Jaffe-Reaktion TPB = Tetraphenylborat-Methode			

Tab.4 :Zusammenstellung der für die verschiedenen Gruppen errechneten Regressionsgeraden mit den zugehörigen Korrelationskoeffizienten. Funktionelle Abhängigkeiten: $J=f(TPB)$ und $J-TPB=f(TPB)$.

Funktionelle Abhängigkeit $y=f(x)$	Vergleich zwischen den Regressionskoeffizienten (bzw. Steigungen) der Geraden		Signifikanz
J=f(TPB)	$y_{R(w)}$	$y = x$ (45°-Gerade)	-
	$y_{R(m)}$		-
	$y_{R(w+m)}$		-
	$y_{R(p)}$		(+)
	$y_{R(w+m+p)}$		+
	$y_{R(w)}$	$y_{R(m)}$	-
	$y_{R(p)}$	$y_{R(w+m)}$	-
	$y_{R(p)}$	$y_{R(w+m+p)}$	-
J-TPB=f(TPB)	$y_{R(w)}$	$y = 0$ (x-Achse)	-
	$y_{R(m)}$		-
	$y_{R(w+m)}$		-
	$y_{R(p)}$		(+)
	$y_{R(w+m+p)}$		+
	$y_{R(w)}$	$y_{R(m)}$	-
	$y_{R(p)}$	$y_{R(w+m)}$	-
	$y_{R(p)}$	$y_{R(w+m+p)}$	-
w : Normale Kreatininwerte weiblicher Versuchspersonen m : " " " männlicher p : Pathologische Kreatininwerte männlicher und weiblicher Versuchspersonen			
Irrtumswahrscheinlichkeiten		+ : $p < 0.01$ (+) : $p < 0.05$ - : $p > 0.05$	

Tab.5 : Vergleich der Regressionskoeffizienten der für die einzelnen Gruppen errechneten Regressionsgeraden untereinander, mit der 45°-Geraden für J=f(TPB) und mit der x-Achse für J-TPB=f(TPB).

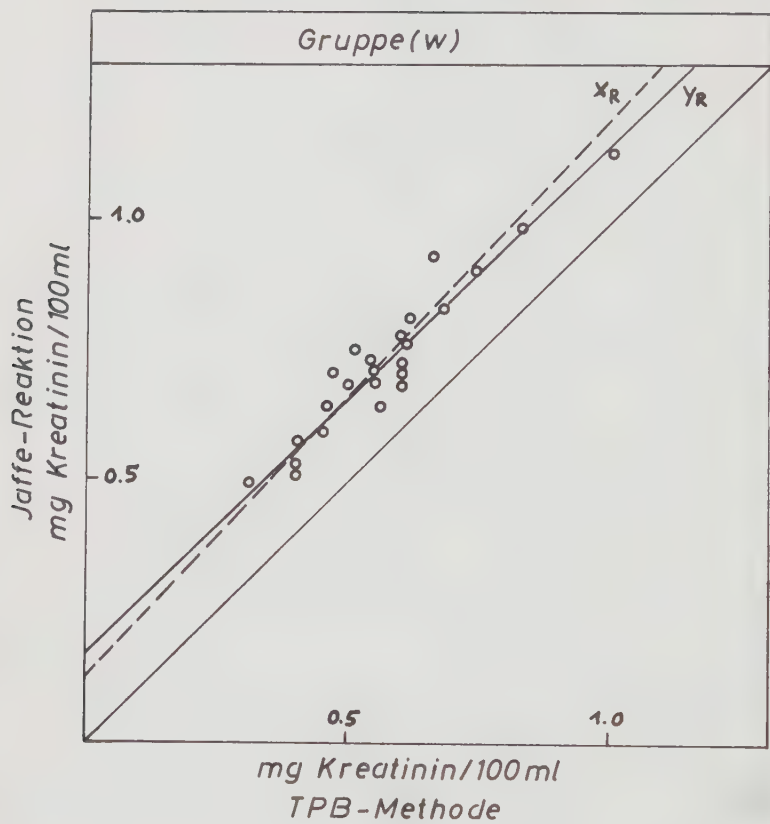


Abb.9: Normale Kreatininwerte weiblicher Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden.

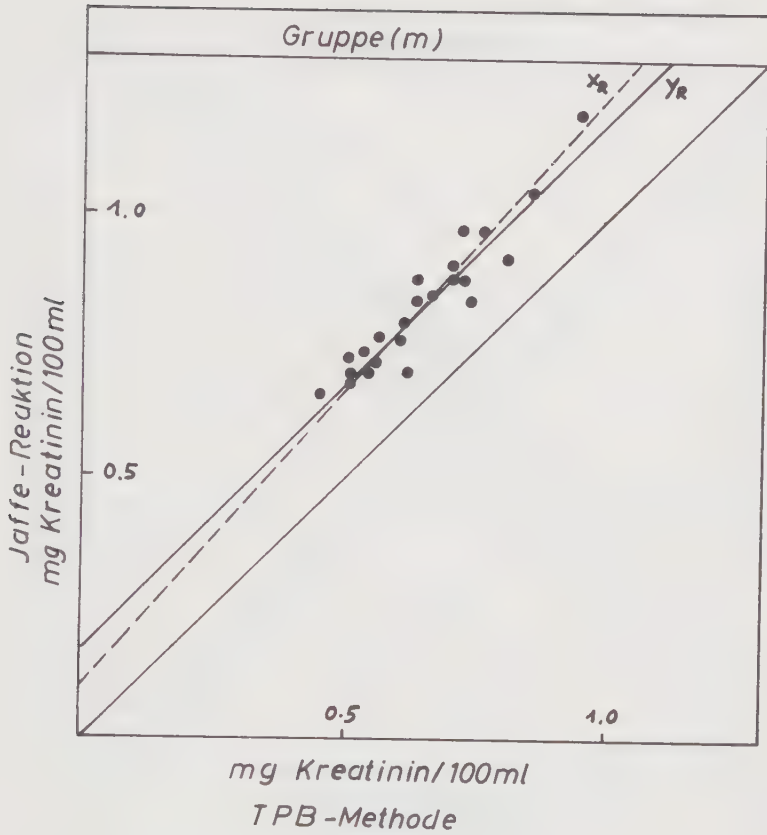


Abb.10: Normale Kreatininwerte männlicher Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden.

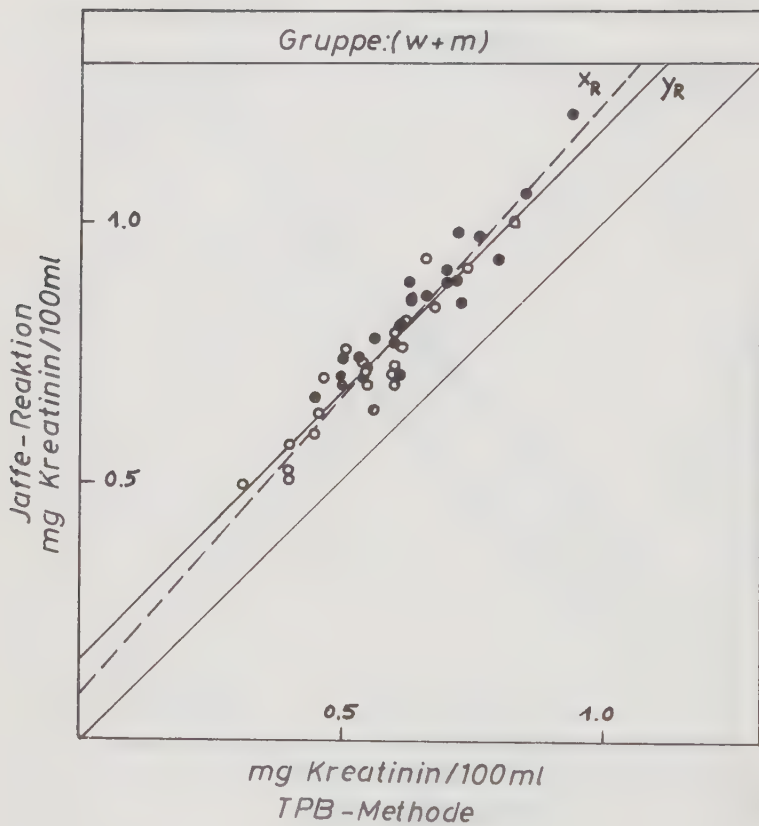


Abb.11: Normale Kreatininwerte weiblicher (Kreise) und männlicher (Punkte) Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden.

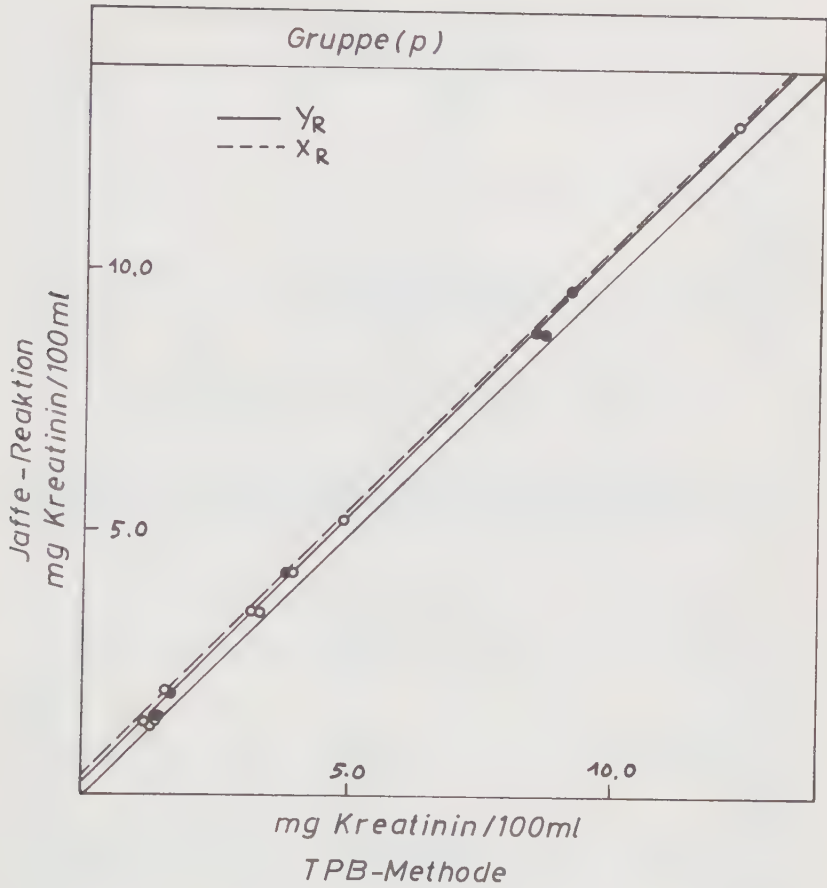


Abb.12: Pathologische Kreatininwerte weiblicher (Kreise) und männlicher (Punkte) Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden.

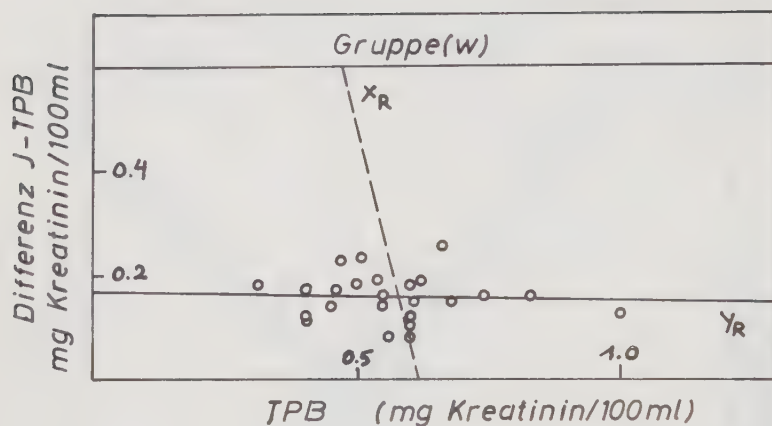


Abb.13: Normale Kreatininwerte weiblicher Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden. Differenz aus Jaffe-Reaktion und TPB-Methode in Abhängigkeit von der TPB-Methode.

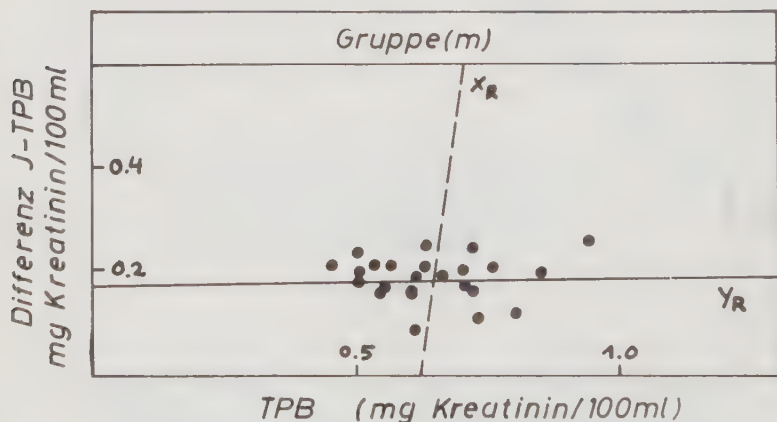


Abb.14: Normale Kreatininwerte männlicher Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden. Differenz aus Jaffe-Reaktion und TPB-Methode in Abhängigkeit von der TPB-Methode.

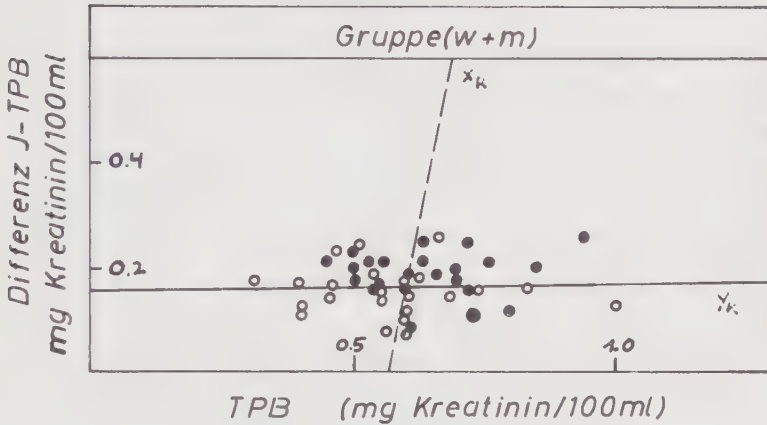


Abb.15: Normale Kreatininwerte weiblicher (Kreise) und männlicher (Punkte) Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden. Differenz aus Jaffe-Reaktion und TPB-Methode in Abhängigkeit von der TPB-Methode.

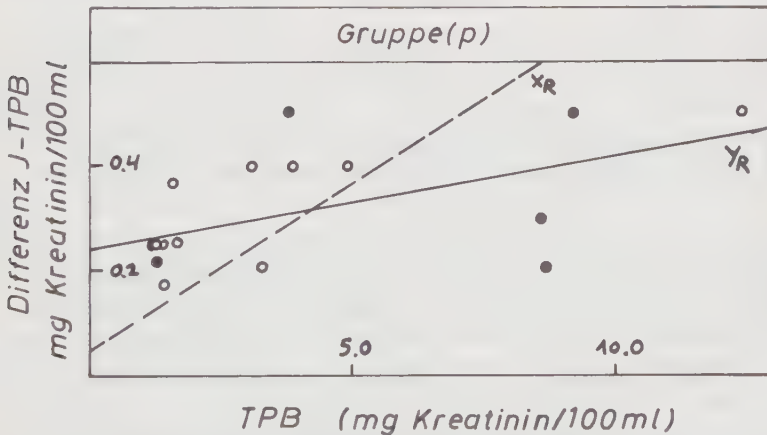


Abb.16: Pathologische Kreatininwerte weiblicher (Kreise) und männlicher (Punkte) Versuchspersonen mit zugehörigen Regressionsgeraden. Differenz aus Jaffe-Reaktion und TPB-Methode in Abhängigkeit von der TPB-Methode.

3. Schwankung des Serumkreatininspiegels beim Einzelindividuum.

Aus den Meßwerten der in unregelmäßigen Zeitabständen an 47 Versuchspersonen mit normaler Nierenfunktion doppelt ausgeführten Kreatininbestimmung wurde für beide Methoden die Standardabweichung der Differenzen zwischen erster und zweiter Messung errechnet (vgl. Tab.6). Sie ist ein Maß für die zeitliche biologische Variation des Serumkreatininspiegels beim gleichen Individuum.

Versuchspersonen	Standardabweichung (mg/100 ml)	
	Jaffe-Reaktion	TPB-Methode
Frauen (W) n=24	0.048	0.054
Männer (M) n=23	0.066	0.068

Tab.6 :Standardabweichungen der Differenzen aus zwei Kreatininbestimmungen bei den gleichen Versuchspersonen mit normaler Nierenfunktion.

Die mit der Jaffe-Reaktion gemessenen Differenzen der Kreatinkonzentration $J_1 - J_2$ zwischen erster und zweiter Bestimmung am gleichen Probanden werden in Abhängigkeit von den entsprechenden mit der TPB-Methode erhaltenen Unterschieden $TPB_1 - TPB_2$ graphisch dargestellt (Abb.17 bis 19). In diese Darstellung geht die Differenz J-TPB zwischen beiden Methoden, - der Gehalt des Serums an Nichtkreatininchromogenen -, nicht mehr ein. Wenn beide Methoden gleichsinnig variierten, müßten die Punkte auf der 45°-Geraden liegen.

Die Abbildungen 17 bis 19 für die Kollektive aus weiblichen (Gruppe W), männlichen (Gruppe M) und aus genannten beiden Gruppen zusammengefaßten Versuchspersonen (Gruppe W+M) zeigen Punkteschwärme, die um den Nullpunkt streuen, aber eine Richtungstendenz im Sinne der Geraden $y=x$ andeuten. Mit Hilfe der Korrelations- und Regressionsrechnung wurden die den einzelnen Gruppen zugehörigen Regressionsgeraden ermittelt, die etwa die Hälfte der Steigung der Geraden $y=x$ aufweisen. Die Korrelationskoeffizienten sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.01$ statistisch gesichert. Eine signifikante Abweichung der einzelnen Regressionskoeffizienten von dem Steigungsmaß der Geraden $y=x$ kann mit Hilfe des t-Testes nicht nachgewiesen werden ($p > 0.05$). Da die Schwerpunkte der Regressionsgeraden y_R und x_R nahe dem Nullpunkt des Koordinatensystems liegen, ist es nach den genannten statistischen Daten zulässig, einen zur Geraden $y=x$ parallelen Verlauf der Regressionsgeraden mit geringer Nullpunktverschiebung anzunehmen.

Die graphischen Darstellungen zeigen weiter, daß die Häufigkeit gegenläufiger Variation der Differenzen aus erster und zweiter Bestimmung (Punkte im 2. und 4. Quadranten des Koordinatensystems) geringer ist, als die der gleichsinnigen Zu- oder Abnahme der genannten Unterschiede auf x- und y-Achse (Punkte im 1. und 3. Quadranten des Koordinatensystems). Zudem liegen die auf den Koordinatenachsen gegensinnig variierenden Punkte alle innerhalb des gemeinsamen Fehlerbereichs beider Bestimmungsmethoden, der aus den Standardabweichungen jeder einzelnen Methode (vgl. Tab.1) ungefähr abgeschätzt werden kann.

Die Ergebnisse der Korrelations- und Regressionsrechnung und der Signifikanzprüfungen sind in Tab.7 zusammengestellt.

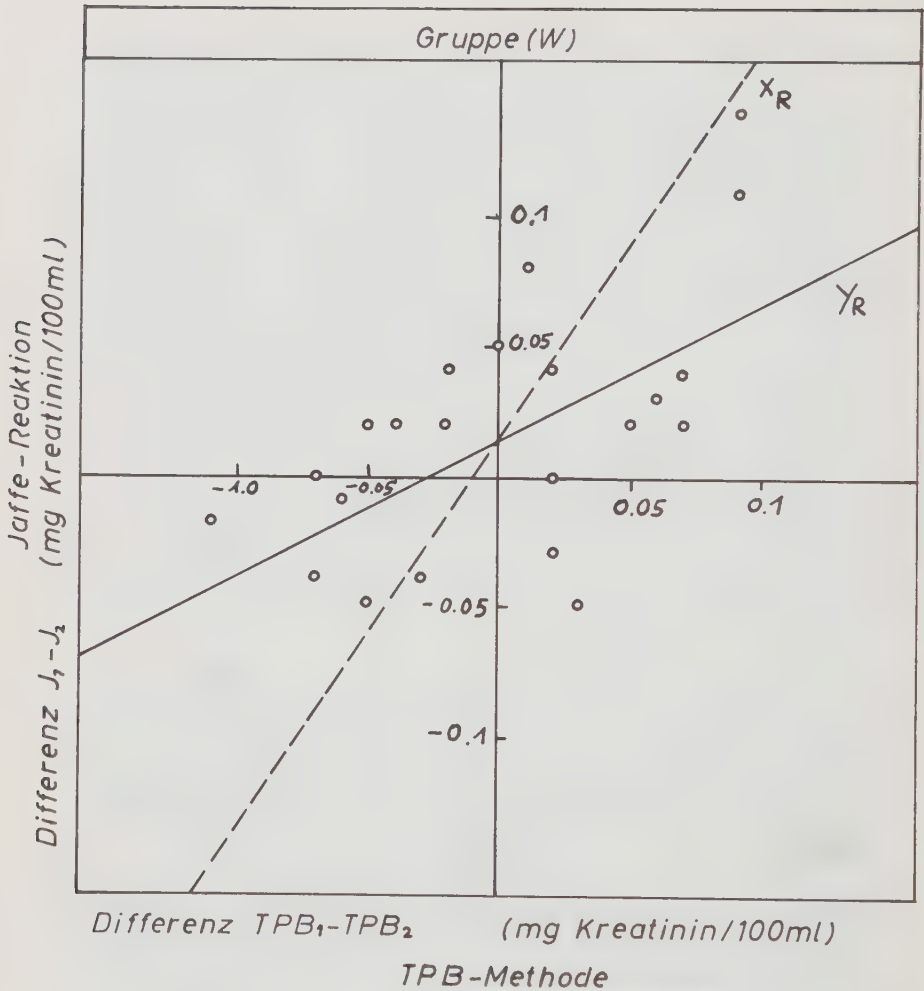


Abb.17: Differenzen zwischen erster und zweiter Kreatininbestimmung in zeitlichem Abstand bei 24 nierengesunden Frauen mit zugehörigen Regressionsgeraden.

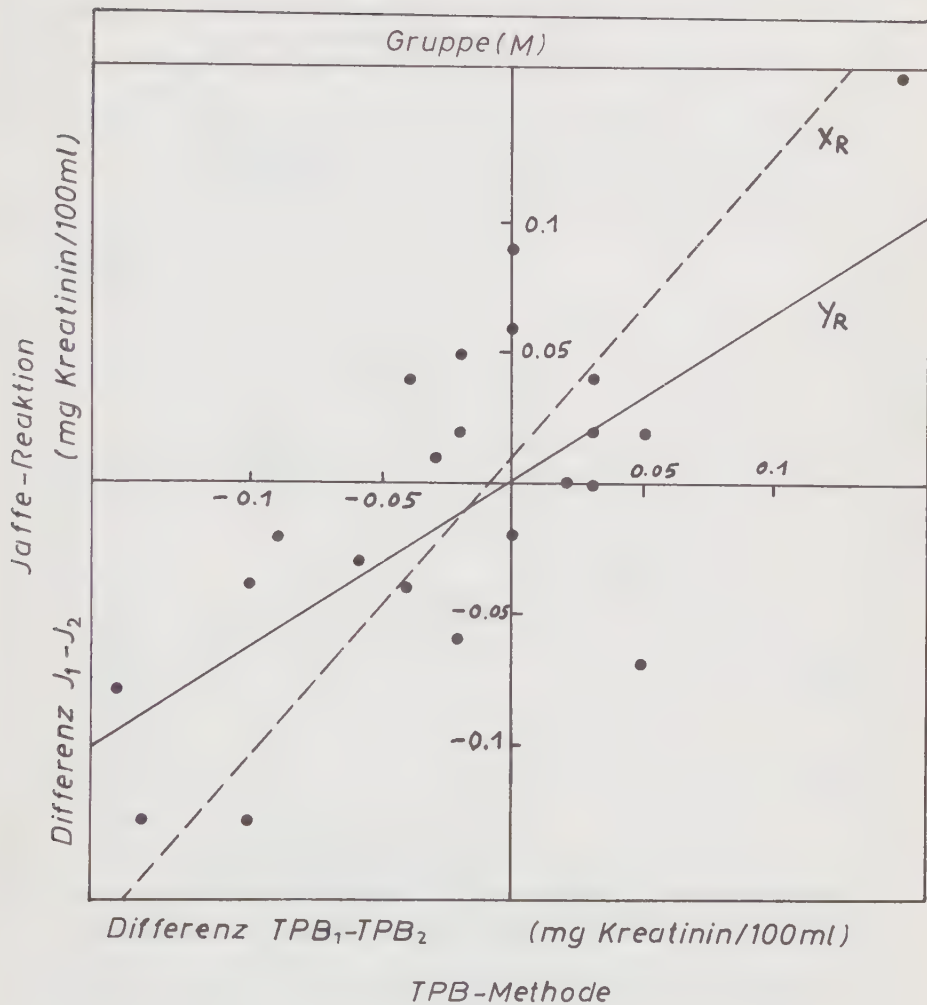


Abb.18: Differenzen zwischen erster und zweiter Kreatininbestimmung in zeitlichem Abstand bei 23 nierengesunden Männern mit zugehörigen Regressionsgeraden.

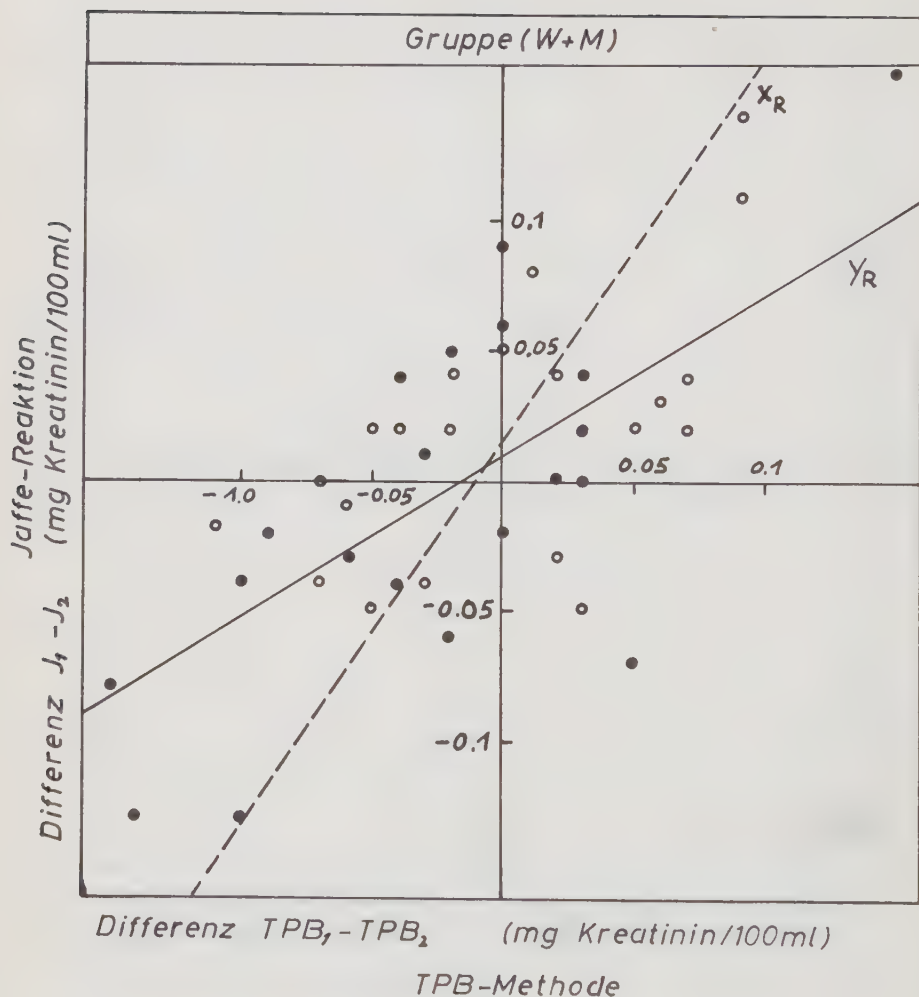


Abb.19: Differenzen zwischen erster und zweiter Kreatininbestimmung in zeitlichem Abstand bei 24 nierengesunden Frauen (Kreise) und 23 nierengesunden Männern (Punkte) mit zugehörigen Regressionsgeraden.

Gruppe	Regressionsgerade y_R und x_R	Signifikanz des	
	Funktionelle Abhängigkeit: $J_1 - J_2 = f(TPB_1 - TPB_2)$	Korrelations- koeffizienten r	Unterschiedes der Steigung zwischen y_R u. $y = x$
Frauen (W) n=24	$y_R = 0.526 x + 0.015$ $x_R = 0.671 y + 0.010$ $r = 0.594$	 +	 -
Männer (M) n=23	$y_R = 0.635 x + 0.002$ $x_R = 0.661 y + 0.012$ $r = 0.641$	 +	 -
Frauen und Männer (W+M) n=47	$y_R = 0.618 x + 0.009$ $x_R = 0.680 y + 0.011$ $r = 0.653$	 +	 -
J : Jaffe-Reaktion TPB : Tetraphenylborat-Methode n : Anzahl der Probanden mit Zweifachbestimmung + : Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$ - : " " $p > 0.05$			

Tab.7 : Zusammenstellung von Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Signifikanzprüfungen für die Abhängigkeit $J - J = f(TPB - TPB)$.

$J - J$ bzw. $TPB - TPB$ bedeutet die Differenz der zu zwei verschiedenen Zeitpunkten am gleichen Probanden mit der Jaffe-Reaktion bzw. der Tetraphenylborat-Methode bestimmten Kreatininwerte.

E. D i s k u s s i o n

Das Problem der quantitativen Bestimmung des Kreatinins in biologischen Substraten ist bis heute noch nicht befriedigend gelöst. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu der klinischen Bedeutung der Kreatininbestimmung in der Diagnostik der Nierenfunktion. Die routinemäßige Kreatininanalyse im klinisch-chemischen Laboratorium verlangt bei einfach und schnell durchzuführendem Analysenverfahren größtmögliche Präzision. Wie die im methodischen Teil gegebene Übersicht über die Vielzahl der im Zeitraum von fünfzig Jahren vorgeschlagenen Bestimmungsmethoden zeigt, hat man immer wieder versucht, diesen Anforderungen gerecht zu werden. Dabei waren manche Autoren bemüht, das bis heute gebräuchliche, auf der Grundlage der Entdeckungen von JAFFE durch FOLIN eingeführte Standardverfahren durch Modifikationen zu verbessern (TAUSSKY u.a.). Andererseits war man aber auch bestrebt, mit anderen chemischen (BENEDICT u. BEHRE; LANGLEY u. EVANS; BARCLAY u. KENNEY; STELGENS; SULLIVAN u. IRREVERRE; BEYERMANN u.a.), physikalisch-chemischen (GREENWALD u. MC GUIRE; HARE; ADAMS, DAVIS u. HANSEN u.a.) und biologischen (MILLER u. DUBOS) Grundkonzeptionen neue und spezifischere Analysenverfahren zu entwickeln.

Die in der vorliegenden Arbeit neben der alteingeführten Jaffe-Reaktion erstmals zu Untersuchungen an einem klinischen Patientengut verwendete Tetraphenylborat-Methode nach BEYERMANN ist eingehend auf den Störeinfluß von Fremdstoffen untersucht worden und zeigt hohe Spezifität (BEYERMANN). Die Genauigkeit dieses Verfahrens hinsichtlich der selektiven Bestimmung des Kreatinins ist auch durch den Vergleich mit dem Fullererde-Verfahren (Lloyd's Reagenz) gut gesichert (BEYERMANN, GEROK u. GROTH), das in der Literatur häufig zu Vergleichszwecken verwendet wird und als spezifisch gilt.

Der Zeitbedarf für die Tetraphenylborat-Methode ist etwa doppelt so groß wie bei der Jaffe-Reaktion. Wegen der vermehrten Reaktionsschritte wird die Zahl der Fehlerquellen größer. Sorgfältiges Arbeiten ist deshalb unumgänglich. Wie aus dem Vergleich von Standardabweichungen und Variationskoeffizienten hervorgeht, ist der methodische Fehler der Tetraphenylborat-Methode geringfügig größer als derjenige der Jaffe-Reaktion.

Die Normalwerte für den Kreatiningehalt im Serum werden besonders in der älteren Literatur recht unterschiedlich angegeben. Tab. 8 zeigt eine Zusammenstellung von Meßergebnissen verschiedener Autoren, um den Vergleich mit den von uns ermittelten Meßwerten zu erleichtern.

Tabelle 8 : Normalwerte des Kreatinins im Serum (mg/100 ml)			
Autoren	Kreatinin und Nichtkreatinin-chromogene	"wahres Kreatinin"	
KOSTIR u. SONKA	1.0	0.48	
TAUSSKY		0.5-1.0	
VAN PILSUM		0.6	
VAN PILSUM u. BOVIS	1.0	0.8	
MILLER u. DUBOS	1.09 (0.62-1.28)	0.99 (0.62-1.24)	
HAUGEN	0.91 (0.6-1.3)		
BROD u. SIROTA	0.91 (0.64-1.1)		
	Frauen Männer	Frauen	Männer
SIMS u. KRANTZ		0.67	0.73
DOOLAN, ALPEN u. THEIL	0.98 1.17	0.82	1.01

Wir fanden mit beiden Methoden Mittelwerte, die etwas niedriger liegen, als vergleichbare normale Kreatininwerte aus Tab. 8. Der Kreatiningehalt im Serum ist proportional der Gesamtmenge an Kreatinphosphat, diese wiederum hängt von der Muskelmasse ab (BORSOOK u. DUBNOFF). Wenn man berücksichtigt, daß es sich bei dem von uns untersuchten Patientengut vorwiegend um bettlägerige Personen mit eventuellen mehr oder weniger starken Inaktivitätsatrophien handelte, findet der niedrigere mittlere Kreatininspiegel eine Erklärung. Exakte Vergleiche zwischen Muskelmasse und Kreatininkonzentration im Serum wurden von uns nicht angestellt.

Obwohl PLASS schon 1917 einen Unterschied der Kreatininkonzentration bei Männern und Frauen feststellte, haben viele spätere Untersucher diese Tatsache nicht berücksichtigt. DOOLAN, ALPEN u. THEIL zeigten an einem Kollektiv von 34 Versuchspersonen, von denen genaue anthropometrische Daten vorlagen, daß die Geschlechtsunterschiede verschwinden, wenn man die Kreatininwerte auf das Gewicht der Muskelmasse bezieht. Aus Mangel von repräsentativen Schätzgrößen für die Muskelmasse verzichteten wir auf eine Überprüfung dieses Befundes an unserem Material. Aber auch hier prägt sich die Differenz der mit Jaffe-Reaktion bzw. Tetraphenylborat-Methode gemessenen Serumkonzentrationen zwischen Frauen und Männern mit Werten von 0.14 bzw. 0.12 mg/100 ml deutlich aus und erweist sich als statistisch gesichert ($p < 0.01$).

Es ist schon lange bekannt, daß die Jaffe-Reaktion den wahren Kreatiningehalt verfälscht wiedergibt, da bei ihrer Anwendung die Nichtkreatininchromogene mit erfaßt werden. Die Tetraphenylborat-Methode bestimmt, wie im methodischen Teil beschrieben, nahezu spezifisch nur Kreatinin. In unseren Untersuchungen liefert die Differenz beider Methoden das Maß für die Konzentration an Nichtkreatininchromogenen im Serum. Die von uns gefundenen Mittelwerte der Konzentrationen der Nichtkreatininchromogene von 0.17 - 0.15 - 0.32 mg/100 ml

für Männer und Frauen des Normalbereichs und für die pathologischen Fälle stimmen gut überein mit den entsprechenden Werten 0.16 - 0.14 - 0.65 mg/100 ml, die DOOLAN, ALPEN u. THEIL in einer neueren Arbeit angeben. Die zugehörigen Standardabweichungen liegen bei uns in gleicher Reihenfolge bei 0.08 - 0.07 - 0.12 mg/100 ml, bei den genannten Autoren betragen sie 0.06 - 0.05 - 0.50. DOOLAN u. Mitarb. finden, daß der prozentuale Anteil der Nichtkreatininchromogene an dem gesamten Jaffe-positiven Material im Serum von niedrigen zu hohen Kreatininwerten immer kleiner wird, was auch aus unseren Befunden hervorgeht. Sie kommen deshalb zu dem Schluß, daß "die Bedeutung der Nichtkreatininchromogene sich umgekehrt proportional zu der aktuellen Serumkonzentration verhält". Diese mehr beschreibende Aussage gibt keinen Einblick in die wahren Zusammenhänge zwischen Nichtkreatininchromogenen und "wahrem Kreatiningehalt" in den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

Um zu präzisen Vorstellungen über diese Beziehung zu gelangen, führten wir eine Korrelations- und Regressionsrechnung durch. Es ergab sich, daß bei zunehmenden "wahren Kreatininwerten" der Anteil der Nichtkreatininchromogene im Normalbereich bei Männern und Frauen konstant bleibt. Dabei ist dieser Anteil natürlich den relativ großen, durch die Standardabweichung beschriebenen Schwankungen unterworfen. Bei den pathologischen Kreatininkonzentrationen stellten wir mit zunehmenden "wahren Kreatininwerten" einen statistisch auffälligen Anstieg ($p < 0.05$) der Nichtkreatininchromogene fest. Bei normalen Kreatininwerten besteht demnach keine gesetzmäßige Kopplung der Zu- oder Abnahme der Kreatininkonzentration mit der Zu- oder Abnahme des Serumspiegels an Nichtkreatininchromogenen. Da letztere Stoffe in keinem biochemischen Zusammenhang mit dem Kreatinin stehen, anderen und untereinander verschiedenen Stoffwechselwegen folgen und allenfalls teilweise in quantitativ unterschiedlichem Ausmaß den physiologischen Ausscheidungsweg über die Niere mit dem

Kreatinin gemeinsam haben, ist ein solcher gesetzmäßiger Zusammenhang auch nicht zu erwarten.

Bei den pathologischen Werten deutet die Zunahme der Nichtkreatininchromogene mit steigendem Kreatininspiegel auf eine gemeinsame Retention bei gestörter Ausscheidungsfunktion der Niere hin. Dieser Befund ist schon früher, meist anhand weniger Meßwerte beschrieben worden (MILLER u. DUBOS u.a.). Bei den 16 Beobachtungen unserer Arbeit besteht zwischen den gemessenen Kreatininwerten eine ausgesprochen enge Korrelation ($r=0.99$), wie sie sonst fast nur bei physikalischen Gesetzmäßigkeiten vorkommt. Wegen der geringen Anzahl der Meßwerte bleibt die endgültige Klärung dieses Zusammenhanges künftigen Untersuchungen vorbehalten.

Wie die zweifachen Bestimmungen an gleichen Probanden ergaben, ist der aus "wahrem Kreatinin" und Nichtkreatininchromogenen zusammengesetzte normale Serumspiegel des gesamten chromogenen Materials beim Einzelindividuum nur geringen Schwankungen unterworfen. Auch DOOLAN, ALPEN u. THEIL bezeichnen die Kreatininkonzentration im Serum des gleichen Individuum als ziemlich konstant und unbeeinflusst von Nahrungsaufnahme, Harnausscheidung und Muskelbetätigung.

Will man abschließend die Jaffe-Reaktion und die Tetraphenylolaborat-Methode auf Grund der Kenntnis ihrer Methodik und der bei ihrem Vergleich erzielten Ergebnisse wertend gegeneinander abwägen, so kommt man zu folgenden Schlußfolgerungen. Die Jaffe-Reaktion ist bei der Routinearbeit der Tetraphenylolaborat-Methode vorzuziehen, da sie schnelleres und bequemerer Arbeiten mit niedrigeren Kosten und geringerer Störanfälligkeit verbindet. Ihre Bedeutung als Suchtest in der Diagnostik von Nierenerkrankungen wird nicht eingeschränkt, zumal bei stärkerer Kreatininretention der prozentuale Wert ihrer Fehlmessung geringer wird und keine falschen Interpretationen des Meßwertes verursacht. Wenn Fragestellungen bestehen, die

die Kenntnis der echten Kreatininkonzentration wünschenswert erscheinen lassen, ist die Tetraphenylborat-Methode zur präzisen und selektiven Kreatininbestimmung gut geeignet.

F. Zusammenfassung

Zwei Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins im Serum, die Jaffe-Reaktion und die Tetraphenylborat-Methode wurden verglichen. Die Tetraphenylborat-Methode, bei der man Kreatinin vor der Bestimmung selektiv aus dem Serum isoliert, wurde erstmals zur Kreatininanalyse an einem größeren Patientengut benutzt. 235 Frauen und 281 Männer mit normaler Nierenfunktion zeigten im Mittel einen Serumkreatiningehalt von 0.72 und 0.60 mg/100 ml.

Die Jaffe-Reaktion ohne vorherige Abtrennung des Kreatinins ergab dabei um durchschnittlich 0.16 mg/100 ml zu hohe Werte, die durch Nichtkreatininchromogene bedingt sind. Bei 16 Fällen mit pathologischer Nierenfunktion wurde ein mittlerer Gehalt an Nichtkreatininchromogenen von 0.32 mg/100 ml gemessen.

Die Beziehungen zwischen den Methoden und zwischen einzelnen Gruppen von Versuchspersonen wurde mit Hilfe statistischer Überlegungen geklärt. Das unterschiedliche Verhalten der Nichtkreatininchromogene im normalen und pathologischen Bereich der Kreatininkonzentration wurde aufgezeigt.

Als Suchtest für die Routinediagnostik wird die Jaffe-Reaktion weiterhin als brauchbar angesehen. Für Fragestellungen, die eine spezifische und selektive Bestimmung des Kreatinins erfordern, empfiehlt sich die Verwendung der Tetraphenylborat-Methode.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ABE, T.

Interaction of picric acid with sodium hydroxide in water.
Nature, London, 187, 234-235 (1960)

ADAMS, W.S., DAVIS, F.W. and HANSEN, L.E.

New method for determination of creatinine by ion exchange separation and ultraviolet spectrophotometry.

Analyt. Chem. 34, 854-856 (1962)

ALLINSON, C.M.J.

A specific enzymatic method for the determination of creatinine and creatinine in blood.

J. Biol. Chem. 157, 169-172 (1945)

ANKER, R.M.

Determination of creatine and creatinine in urine. Correction factor for determination of 24-hour urinary excretion.

J. Laborat. Clin. Med. 43, 798-801 (1954)

ARCHIBALD, R.M.

Reactions of creatinine with alkaline picrate.

J. Biol. Chem. 237, 612 (1962)

BARCLAY, J.A. and KENNEY, R.A.

A method for the estimation of creatinine.

Biochem. J. 41, 586-589 (1947)

BARRET, E. and ADDIS, T.

The serum creatinine concentration of normal individuals.

J. Clin. Invest. 26, 875-878 (1947)

BAUMANN, L. and HINES, H.M.

The origine of creatine.

J. Biol. Chem. 31, 549-559 (1919)

BEARD, H.H. and BARNES, B.O.

The influence of feeding proteins, amino acids and related substances upon creatine-creatinine metabolism.

J. Biol. Chem. 94, 49-69 (1931/32)

BEARD, H.H. and BOGESS, T.S.

The effect of parenteral injection of amino acids and related substances upon creatinine formation and storage.

J. Biol. Chem. 114, 771-781 (1936)

BEHRE, J.A. and BENEDICT, S.R.

Studies in creatine and creatinine metabolism. IV. On the question of the occurrence of creatinine and creatine in blood.

J. Biol. Chem. 52, 11-33 (1922)

BENEDICT, S.R. and BEHRE, J.A.

Some applications of a new color reaction for creatinine.

J. Biol. Chem. 114, 515-532 (1936)

BENEDICT, S.R. and OSTERBERG, E.

Studies in creatine and creatinine metabolism. V. The metabolism of creatine.

J. Biol. Chem. 56, 229-243 (1923)

BEYERMANN, K.

Die Bestimmung des Kreatinins in Serum und Harn.

Zschr. analyt. Chem. 205, 416-438 (1964)

BEYERMANN, K.

Die Verteilung der Tetraphenylborate von Aminosäuren und Oligopeptiden zwischen wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln.

Zschr. analyt. Chem. 212, 199-211 (1965)

BEYERMANN, K.

Anreicherung von biogenen Aminen und Alkaloiden durch Ausschütteln als Tetraphenylborat.

Zschr. analyt. Chem. 215, 316-324 (1966)

BEYERMANN, K.: in Vorbereitung.

BEYERMANN, K., GEROK, W. und GROTH, U.: in Vorbereitung.

BLOCH, K. and SCHOENHEIMER, R.

Rate of formation and disappearance of body creatinine in normal animals.

J. Biol. Chem. 138, 155-166 (1941)

BODANSKY, M., DUFF, V.B. and HERRMANN, C.L.

Comparison of glycine and guanidoacetic acid as precursors of creatine.

J. Biol. Chem. 115, 641-652 (1936)

BONSNES, R.W. and TAUSSKY, H.H.

On the colorimetric determination of creatine by the Jaffe reaction.

J. Biol. Chem. 158, 581-591 (1945)

BORSOOK, H. and DUBNOFF, J.W.

The hydrolysis of phosphocreatine and the origine of urinary creatinine.

J. Biol. Chem. 168, 493-508 (1947)

BORSOOK, H. and DUBNOFF, J.W.

The formation of creatine from glycocytamine in the liver.
J. Biol. Chem. 132, 559-574 (1940)

BROD, J. and SIROTA, J.H.

Renal clearance of endogenous creatinine in man.
J. Clin. Invest. 27, 645-654 (1948)

CANTONI, G.L. and VIGNOS, P.J.

Enzymatic mechanism of creatine synthesis.
J. Biol. Chem. 209, 674-659 (1954)

CAVALLI-SFORZA, L.

Grundbegriffe der Biometrie.
Stuttgart 1964

CHANUTIN, A.

The fate of creatine when administered to man.
J. Biol. Chem. 67, 29-41 (1926)

CLARKE, J.T.

Colorimetric determination and distribution of urinary creatinine and creatine.
Clin. Chem. 7, 371-383 (1961)

CLOTTEN, R. und CLOTTEN, A.

Hochspannungselektrophorese: pp. 176-178, 292, 491-493
Stuttgart 1962

COOPER, J.M. and BIGGS, H.G.

An evaluating of four methods of measuring urinary creatinine.
Clin. Chem. 7, 665-673 (1961)

DOULAN, P.D., ALFEN, E.L. and THEIL, G.B.

A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine.

Amer. J. Med. 32, 65-79 (1962)

DUBOS, R. and MILLER, B.F.

The production of bacterial enzymes capable of decomposing creatinine.

J. Biol. Chem. 121, 429-445 (1937)

EDGAR, G. and SHIVER, H.E.

The equilibrium between creatine and creatinine in aqueous solution. The effect of hydrogen ion.

J. Amer. Chem. Soc. 47, 1179-1188 (1925)

EDGAR, G. and WAKEFIELD, R.A.

The kinetics of the conversion of creatine into creatinine in hydrochloric acid solution.

J. Amer. Chem. Soc. 45, 2242-2245 (1923)

FOLIN, O.

Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harne.

Zschr. physiol. Chem. 41, 223-242, (1904)

FREUDENBERG, K.

Grundriß der medizinischen Statistik: pp. 149-181

Stuttgart 1962

GOETZE, E.

Einrichtungen und Methoden des klinischen Labors.

Jena 1963

GREENWALD, J.

Chemistry of Jaffe's reaction for creatinine.

J. Biol. Chem. 80, 103-106 (1928)

GROSS, E.G. und STEENBOCK, H.

Kreatinurie. III. Die Wirkung von Schilddrüsenfütterung auf die Kreatinurie.

J. Biol. Chem. 47, 45-52 (1921)

HAHN, A. und BARKAN, G.

Über die gegenseitige Umwandlung von Kreatin in Kreatinin.

Zschr. Biol. 72, 25-36 und 305-313 (1920)

HAHN, A. und MEYER, G.

Über die gegenseitige Umwandlung von Kreatin in Kreatinin.

Zschr. Biol. 78, 91-118 (1923)

HARE, R.S.

Endogenous creatinine in serum und urine.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y., 74, 148-151 (1950)

HASELOFF, O.W. und HOFFMANN, H.J.

Kleines Lehrbuch der Statistik: 2. Aufl., pp. 51-57

Berlin 1965

HAUGEN, H.N.

The determination of endogenous creatinine in plasma and urine.

Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 5, 48-57 (1953)

HAUGEN, H.N. and BLEGEN, E.M.

The true endogenous creatinine clearance.

Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 5, 67-71 (1953)

HAUGEN, H.N. and BLEGEN, E.M.

Plasma creatinine concentration and creatinine clearance in clinical work.

Ann. Int. Med. 43, 731-739 (1955)

HAUGEN, H.N.

Glucose and acetone as sources of errors in plasma creatinine determinations.

Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 6, 17-21 (1954)

HENRY, R.J.

Clinical chemistry: pp. 287-302

New York 1964

HOBERMAN, H.D., SIMS, E.A.H. and PETERS, J.H.

Creatine and creatinine metabolism in the normal adult studied with the aid of isotopic nitrogen.

J. Biol. Chem. 172, 45-58 (1948)

HUNTER, A.

Creatine and creatinine.

London 1928

HUNTER, A. and CAMPBELL, W.R.

The probable accuracy in whole blood and plasma of colorimetric determination of creatinine and creatine.

J. Biol. Chem. 32, 195-209 (1917)

JAFFE, M.

Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins.

Zschr. physiol. Chem. 10, 391-400 (1886)

KANTUREK, V., PAKOVSKY, V. and SONKA, J.

Specificity of Lloyd's reagent for determination of creatine in serum.

Cas. lék. česk. 93, 435-436 (1954)

KLÉRKER, K.O.

Beitrag zur Kenntnis des Kreatins und Kreatinins im Stoffwechsel des Menschen.

Biochem. Zschr. 3, 45-87 (1907)

KOSTIR, J.V. and RABEK, V.

The detection of Jaffe-positive substance in blood serum by paper partition chromatography. The problem of apparent creatinine.

Biochim. biophysica acta, N.Y., 5, 210-233 (1950)

KOSTIR, J.V. and SONKA, J.

Creatine estimation in blood serum. A new method.

Biochim. biophysica acta, N.Y., 8, 86-89 (1952)

KOSTIR, J.V. and PRISTOUPIL, T.J.

Paper chromatography of glycocyamidine in urine.

Chem. Abstr. 49, 1132 i (1955)

LANGLEY, W.D. and EVANS, M.

The determination of creatinine with sodium 3,5-dinitrobenzoate.

J. Biol. Chem. 115, 333-341 (1936)

LINNEWEH, F. und LINNEWEH, W.

Über Fehlerquellen der colorimetrischen Kreatinbestimmung nach dem Folinschen Prinzip.

Klin. Wschr. 13, 389-591 (1934)

LOKEN, F.

On the determination of creatinine in plasma by the Jaffe reaction after adsorption to Lloyd's reagent.

Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 6, 325-334 (1954)

MAW, G.A.

The detection of creatine and creatinine by partition chromatography.

Biochem. J. 43, 139-142 (1948)

Mc KAY, E.M. and BARNES, R.H.

Influence of amino acids and protein diet upon creatine content of myocardium.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., N.Y., 32, 1562-1563 (1935)

MERTZ, D.P.

The differential diagnosis of marginal and residual conditions in kidney diseases using modern clearance methods.

Internist, Berlin, 3, 661-668 (1962)

MILLER, B.F. and DUBOS, R.J.

Studies on the presence of creatinine in human blood.

J. Biol. Chem. 121, 447-456 (1937)

MILLER, B.F. and DUBOS, R.J.

Determination by a specific enzymatic method of the creatinine content of blood and urine from normal and nephritic individuals.

J. Biol. Chem. 121, 457-464 (1937)

MYERS, V.C. and FINE, M.S.

The metabolism of creatine and creatinine.

J. Biol. Chem. 21, 289-293 (1915)

OWEN, J.A., IGGO, B., SCANDRETT, F.Y. and STEWART, C.P.

The determination of creatinine in plasma and in urine; a critical examination.

Biochem. J. 58, 426-437 (1954)

PLASS, E.D.

Placental transmission: Creatinine and creatine in whole blood and plasma of mother and fetus.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 28, 137-152 (1917)

POPPER, H., MANDEL, E. und MAYER, H.

Zur Kreatininbestimmung im Blut.

Biochem. Zschr. 291, 354-367 (1937)

RALSTON, M.

Plasma creatinine.

J. Clin. Path. 8, 160-162 (1955)

REHBERG, P.B.

Studies of kidney function; rate of filtration and reabsorption in human kidney.

Biochem. J. 20, 447-460 (1926)

REUBI, F.

Nierenkrankheiten: pp. 65-69, 89-91

Bern und Stuttgart 1960

ROSCOE, M.H.

The estimation of creatinine in serum.

J. Clin. Path. 6, 201-207 (1953)

ROSCOE, M.H.

Plasma chromogen and the endogenous creatinine clearance.

J. Clin. Path. 11, 173-176 (1958)

SARRE, H.

Nierenkrankheiten: pp. 117-120

Stuttgart 1958

SHAPIRO, B.G. and ZWARENSTEIN, H.

The influence of the administration of arginine and histidine on the excretion of creatinine.

Biochem. J. 26, 1880-1889 (1932)

SIMS, E.A.H. and KRANTZ, K.E.

Serial studies of renal function during pregnancy and the puerperium in normal women.

J. Clin. Invest. 37, 1764-1778 (1958)

STELGENS, P.

Über die Kreatinkörperbestimmung mit Kaliumquecksilber-rhodanid und Dithizon. I. Mitteilung.

Biochem. Zschr. 323, 480-487 (1953)

STELGENS, P.

Über die Kreatinkörperbestimmung mit Kaliumquecksilber-rhodanid und Dithizon. II. Mitteilung.

Biochem. Zschr. 324, 228-236 (1953)

SULLIVAN, M.X. and IRREVERRE, F.A.

A highly specific test for creatinine.

J. Biol. Chem. 233, 530-533 (1958)

TAUSSKY, H.H.

Creatinine and creatine in urine and serum:

in Standard methods of clinical chemistry, ed. by Seligson, D., vol. 3, pp. 99-113

New York 1961

TAUSSKY, H.H.

A procedure increasing the specificity of the Jaffe reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma.

Clin. chim. acta 1, 210-224 (1956)

TAUSSKY, H.H. and KURZMANN, W.

A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffe reaction.

J. Biol. Chem. 208, 853-861 (1954)

THOMAS, K. und GOERNE, M.G.H.

Das Verhalten der ϵ -Guanido-, ϵ -Ureido-, und ϵ -Amino-n-capronsäure im Organismus des Kaninchens.

Zschr. physiol. Chem. 92, 163-176 (1914)

THOMAS, K., KAPFHAMMER, J. und FLASCHENTRÄGER, B.

Über 5-Methylornithin und 5-Methylarginin. Zur Frage der Herkunft des Kreatins. IV. Mitteilung.

Zschr. physiol. Chem. 124, 75-102 (1923)

VAN PILSUM, J.F.

Determination of creatinine and related guanidinium compounds:

in Standard methods of biochemical analysis, ed. by Glick, D., vol. 7, pp. 193-215

New York 1959

VAN PILSUM, J.F. and BOVIS, M.

Effect of various protein precipitants on recoveries of creatinine added to plasma.

Clin. Chem. 2, 90-94 (1957)

VAN PILSUM, J.F., MARTIN, R.P., KITO, E. and HESS, J.

Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine and methylguanidine in biological fluids.

J. Biol. Chem. 222, 225-236 (1956)

VAN SLYKE, D.D., RHODAS, C.P., HILLER, A. and ALVING, A.S.

Relationship between urea excretion, renal blood flow, renal oxygen consumption, and diuresis; mechanism of urea excretion.

Amer. J. Physiol. 103, 336-374 (1934)

WEISE, W. und TROPP, C.

Untersuchungen über die Jaffesche Pikrinsäurereaktion.

Zschr. physiol. Chemie 178, 125-138 (1928)

Zum Schluß danke ich Herrn Professor
Dr. W. Gerok, daß er mir die Bearbeitung
des Themas ermöglichte und die Arbeit durch
seine Beratung förderte.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor
Dr. Dr. S. Koller und Herrn Dr. Fassl für die
Unterstützung bei der statistischen Auswertung
der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Dozent
Dr. K. Beyermann vom Institut für Anorganische
Chemie und Kernchemie der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz für seine wertvollen Hinweise
bei der Durchführung der Experimente.

L é b e n s l a u f

Am 2.6. 1941 wurde ich, Ulrich Groth, als Sohn des Polizeibeamten Alfons Groth und seiner Ehefrau Helene geb. Wengenroth in Zehnhausen geboren.

In Kirburg besuchte ich zunächst die Grundschule, dann in Marienberg die Städt. Realschule. Im Jahre 1956 wechselte ich über zur Untersekunda des Staatl. Neuspr. Gymnasiums in Betzdorf / Sieg, wo ich 1960 die Reifeprüfung bestand.

An der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz begann ich 1960 das Studium der Medizin, legte nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach weiteren drei Semestern das Physikum ab.

Die klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls an der Universität Mainz, wo ich am 29.7. 1966 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen abschloß.

Nach dem Staatsexamen vollendete ich die vorliegende Dissertation und begann meine Ausbildung als Medizinalassistent.

1911

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

